



225407

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA.
IZTAPALAPA.**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“ESTUDIO DE MUERTE CELULAR EN LA MADURACIÓN Y
ATRESIA FOLICULAR EN LA OVEJA.”

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGIA DE LA
REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA

ALDO ISRRAEL ALONSO POZOS.

DIRECTOR DE TESIS
DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES

ASESORES
DR. ADOLFO ROSADO GARCÍA.
M. en C. MARCELA VERGARA ONOFRE.

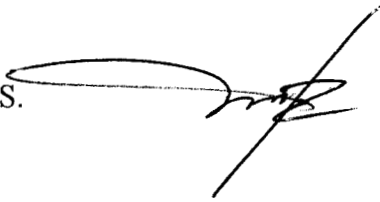
MÉXICO, D. F.

2001

JURADO

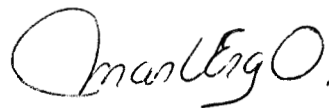
PRESIDENTE.

DRA. ANA MARIA ROSALES TORRES.



SECRETARIO.

M. en C. MARCELA VERGARA ONOFRE



PRIMER VOCAL.

M en C. CLARA ORTEGA CAMARILLO

SEGUNDO VOCAL.

M en C. ALEJANDRO AVALOS RODRÍGUEZ.



EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA DE LA REPRODUCCION DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO Y EN EL LABORATORIO DE BIOLOGIA CELULAR Y CITOMETRIA DE FLUJO DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD IZTAPALAPA.

CON EL APOYO DE LA BECA CREDITO OTORGADA POR EL CONACYT (REGISTRO 137889).

Y UN FINANCIAMIENTO POR PARTE DE CONACYT (PROYECTO No. 1474-N)

AGRADECIMIENTOS:

A LA DRA. ANA MARÍA ROSALES TORRES.

Por su gran paciencia en la dirección y apoyo de esta tesis.

AL DR. ADOLFO ROSADO GARCÍA:

Por plasmar en este trabajo su gran conocimiento.

A LA M. en C. MARCELA VERGARA ONOFRE.

Por sus consejos y observaciones dirigidas a la parte experimental así como en la revisión de esta tesis.

AL M. en C. ALEJANDRO AVALOS RODRÍGUEZ.

Por su ayuda en la parte técnica del uso del citómetro de flujo.

A LA DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ.

Por prestarnos el citómetro de flujo.

A LA M. en C. EDITH CORTEZ BARBERENA.

Por su apoyo técnico en el manejo del citómetro de flujo.

AL DR. HÉCTOR CASTILLO.

Por su asesoría en el análisis estadístico de este trabajo.

AL M. en C. DEMETRIO AMBRIZ.

Por facilitarnos su laboratorio y equipo.

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO: Juanita, Mireya, Dora, Gisela, Héctor, Gerardo, Hugo y Román.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

Por prestarme un poco de su tiempo.

DEDICATORIAS:

A la memoria de los que ya no están con nosotros: Edgardo Alonso Pozos, Juan Pozos, Eufracia Parrado, Eligio Alonso y Rosita Leyte.

A mis Padres: Margarito Anatolio Alonso Leyte y Lucia Pozos Parrado.

A mis hermanos: Abigail, Yubal y Eliseo.

Al amigo incondicional que nunca se aparta de mi.

A mi Familia:

Eliberto Parrado, Erick Pozos; Josué Pozos, Guillermo Pozos, Margarita Pozos, Miguel Vázquez, Miguel Vázquez (hijo), Gamaliel Vázquez, Anabel Vázquez, Luis Vázquez, Rafael Vázquez, Gaspar Pozos, María Pozos, Adriana Pozos, Iran Pozos, Gabriela Pozos, Marco Antonio Pozos, Juana Jaime, Walter Pozos, Marco Antonio (hijo), Aurora Pozos, Juan Pozos, Dafne Pozos, Eduardo Pozos, Brandon, Aquetzali y Ariel.

INDICE

INTRODUCCION.	1
Antecedentes de la producción en México.	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS.	1
I. Ovogénesis.	1
a) Células primordiales.	1
b) Ovogonias.	2
c) ovocitos.	2
II. Foliculogénesis.	3
1) Folículo primordial.	3
1.1) Influencia de la FSH en el reclutamiento inicial.	4
1.2) Participación del ovocito en el reclutamiento inicial.	4
2) Folículos secundarios o preantrales.	5
2.1). Influencia del ovocito, de la granulosa y de la teca en el desarrollo del folículo preantral.	5
2.2) Esteroidogénesis, gonadotropinas y factores de crecimiento en el desarrollo folicular preantral.	5
3) Folículos Antrales.	7
3.1) Compartimentalización de las células de la granulosa.	7
3.2) Reclutamiento cíclico y selección de folículos antrales.	8
3.3) Participación de FSH en el desarrollo del folículo antral.	8
3.4) Participación de enzimas con actividad proteolítica en el desarrollo de folículos antrales.	9
4). El folículo preovulatorio o folículo de Graf.	9
4.1) Participación de las gonadotropinas en la dominancia folicular.	9
4.2) Participación de gonadotropinas y de enzimas en la ovulación del folículo preovulatorio.	10
4.3) Participación de factores de crecimiento en los folículos preovulatorios.	11
4.4) Diferenciación de las células de la granulosa en el estado preovulatorio.	11
III. Atresia folicular.	12
1. Teorías de la atresia.	12
2. Clasificación de la atresia.	13
2.1 Cambios morfológicos y bioquímicos observados durante la atresia.	13
3. Vías privadas de inducción de la atresia.	16
3.1. Gonadotropinas y factores de crecimiento en la atresia.	16
3.2. Inicio de la atresia por ligandos y receptores en la membrana celular	20

3.3. Genes que participan en la atresia folicular.	21
3.3.1 Familia de Bcl-2.	21
3.3.2. P53.	23
3.3.3. WT1.	23
4, Remodelación tisular en el inicio de la atresia folicular.	24
5. Participación de enzimas lisosomales en el inicio de la atresia.	24
IV. Muerte celular en la atresia folicular.	25
1. Tipos de muerte celular en la atresia folicular.	25
1.1. Necrosis.	26
1.2. Apoptosis.	27
1.3. Autofagia o muerte celular citoplásmica.	29
1.4. Diferenciación terminal que conduce a la muerte.	30
2. Necrosis y Apoptosis: son diferentes expresiones morfológicas de una vía ejecutoria común de muerte celular.	30
3. Mitocondria y PTM.	31
3.1 Niveles de ATP y ROS en la etapa de decisión del tipo de muerte celular.	37
4. Participación de los lisosomas en la fase de decisión del tipo de muerte celular.	38
JUSTIFICACIÓN.	43
HIPOTESIS.	44
OBJETIVO GENERAL.	44
OBJETIVO PARTICULAR.	44
MATERIAL Y METODOS.	45
RESULATADOS.	48
DISCUSIÓN.	50
BIBLIOGRAFIA	59

Muerte celular durante la maduración y la atresia folicular en la oveja (*Ovis aries*).

INTRODUCCIÓN.

Antecedentes de la producción de ovinos en México.

De acuerdo con los datos de la FAO, México ocupó el lugar número 40 en la producción mundial de carne de ovinos con 30,413 Ton de carne en el año de 1998, mientras que China, Australia y Nueva Zelanda ocuparon los primeros lugares con 7'519,828; 1'250,000 y 615,331 Ton de carne de ovinos respectivamente para el mismo año (SAGAR, 1998).

En México se consume generalmente carne de pollo, bovino, porcino, pavo, ovino y caprino (SAGAR, 2000a). Existe en México una deficiencia en la producción de ovino y porcino, ya que se importa el 57.7% de carne de ovino en canal para cubrir las demandas del mercado nacional; mientras que en la carne de porcinos, únicamente ha sido necesario importar el 23.8 % para cubrir la demanda nacional. En el año 1999 se produjeron en nuestro país 30,785 Ton de carne de ovinos, lo cual refleja que no ha habido prácticamente incrementos en la producción dentro de los últimos 5 años, ya que este volumen se ha mantenido casi constante durante el periodo de 1993-1999. (SAGAR, 2000b).

Hay una baja productividad del rebaño nacional, ya que el inventario nacional cuenta con alrededor de 6 millones de cabezas, de los cuales el 43% son hembras (2.58 millones de cabezas) y se sacrifican alrededor de 1.63 millones de cabezas al año; lo que representa una producción promedio de 0.6 corderos por hembra por año, mientras que las importaciones ascienden a 41,814 Ton de carne de ovino, que equivalen aproximadamente a 2.2 millones de cabezas (2000b). Lo anterior resalta la importancia de realizar estudios sobre el desarrollo folicular en la oveja que marquen directrices para mejorar el rendimiento reproductivo y alcanzar la eficiencia deseada en las unidades productivas. El desarrollo folicular es un proceso de la biología reproductiva que incluye varios eventos fisiológicos de cuya regulación depende la determinación de cuantos y cuáles folículos ovularán, cuáles se quedarán como reserva y cuáles se perderán por el mecanismo de la atresia.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

I. Ovogénesis.

a). Células primordiales.

Al folículo ovárico se le considera la unidad fisiológica fundamental del ovario, que tiene una función dual, la esteroidogénesis y la ovogénesis. La ovogénesis principia con la formación de las células germinales primordiales, alrededor del octavo día de la vida embrionaria en el ratón (Pedersen, 1970) y hacia la tercera semana de gestación en el embrión humano, dentro del endodermo del saco vitelino, cerca de la alantoides (Van Wagenen and Simpson, 1965), por lo que se consideran de origen extragonadal (Buccione, et al, 1990). Las células germinales primordiales migran hacia la cresta gonadal por medio de movimientos amiboides o por movimientos de tipo laminar sobre células del intestino

(Donovan et al, 1986) hasta su destino final, la cresta genital (Tam and Snow, 1981); una disminución en la intensidad de adhesión de las células a la fibronectina se ha correlacionado con el inicio de la migración de las células germinales primordiales (Franch-Constant et al, 1991), mientras que agentes quimiotácticos esteroideos así como el factor de crecimiento transformante beta, producido por la gónada primordial, dirigen la migración hacia la cresta genital (Godin and Wylie, 1991). Esta migración de células germinales primordiales se acompaña de una gran actividad mitótica que es regulada, por lo menos en los roedores, por varios factores de crecimiento que elevan el nivel intracelular de AMPc estimulando la proliferación de estas células (De Felici, 1993) como es el caso del receptor tirosina cinasa c-kit, que es expresado por la células germinales primordiales, mientras su ligando steel/kit (KL) se encuentra a lo largo de la vía migratoria hasta la cresta genital (Keshet et al, 1991; Orr-Urtreger et al, 1990), se ha demostrado que KL es necesario para la supervivencia y proliferación de las células germinales primordiales en cultivo (Matsui et al, 1991), ya que suprime la apoptosis de las células primordiales (Pesce, et al, 1993).

b). Ovogonias. Tan pronto como la migración de las células germinales termina al colonizar y organizarse en cordones o racimos se convierten en ovogonias (Beaumont and Mandl, 1962), la proliferación de ovogonias en los mamíferos se restringe a las etapas de desarrollo prenatal o, cuando mucho, al periodo inmediato post-natal (Maulcon, 1967); es decir, alrededor del doceavo día de gestación en el ratón (Pederson, 1970) y cerca de la séptima semana de gestación en humanos (Van Wagenen and Simpson, 1965); con excepción del lemur, donde existe alta actividad mitótica de células germinales en la edad adulta (Gerard and Herlant, 1953).

Las ovogonias conservan una frecuencia elevada de mitosis y continúan con su proliferación hasta alcanzar un total de 6-7 millones alrededor de las 20 semanas de gestación en el humano (Wasarman and Albertin, 1994; Forabosco et al, 1991); en este caso la proliferación de ovogonias se acompaña de una degeneración masiva que afecta tanto a células en interfase, como durante la mitosis (Beaumont and Mandl 1962).

Después que las células germinales colonizan el ovario, se da inicio a un proceso de proliferación y reorganización de células somáticas mesenquimatosas y del epitelio celómico que origina el tejido estromal que contiene células germinales rodeadas por células derivadas de la rete ovari, precursoras de las células de la granulosa; de origen mesonéfrico y el tejido estromal que dará origen a las células de la teca interna (Roy and Grewald, 1990).

c). Ovocitos. La interrupción del proceso de mitosis de las ovogonias es acompañada por la transformación de las ovogonias a ovocitos, los cuales inician la meiosis. Es posible que algunos factores originados de la rete ovari, o simplemente el contacto con la rete ovari, induzca a los ovocitos a iniciar la meiosis (Wasarman and Albertini, 1994). El proceso meiótico se inicia en la mayoría de los mamíferos durante la vida prenatal o inmediatamente después de nacer. El ovocito alcanza el estado de diploteno de la profase antes o inmediatamente después de nacer. En este estado y por un proceso aun desconocido, el proceso meiótico se detiene. Los cromosomas se descondensan y reanudan su actividad transcripcional. El ovocito, con un núcleo prominente, conocido como vesícula germinal, entra en dictioteno o estado de diploteno difuso; en esta etapa en el ratón, se observa la expresión del receptor c-kit por el ovocito al tiempo en que éste entra en diploteno sugiriendo de esta manera su participación en el arresto meiótico del ovocito (Horie et al, 1991). Inmediatamente después de que se forma el ovocito es rodeado por una

capa de células denominada pregranulosa, lo que da lugar a la formación del folículo primordial, alrededor de la semana 20 de gestación en humanos (Van Wagenen and Simpson, 1965) y entre el día 1-3 después del nacimiento en la rata (Ohno and Smith, 1964). Se ha sugerido que el orden en que los folículos son reclutados, es el mismo orden en que los ovocitos entrarán en la meiosis durante el desarrollo (Edwards et al, 1977); así los ovocitos que progresan rápidamente en la meiosis se localizan más cerca de la unión corticomédular del ovario y son los primeros en iniciar su crecimiento durante las etapas neonatales, en contraste, los ovocitos que progresan lentamente en su meiosis se localizan cerca de la corteza y son incluidos en los folículos que crecerán tardíamente en la vida (Hirshfiel, 1991). Existe una asociación muy estrecha entre el ovocito y las células de la pregranulosa a través de las uniones membranales que incluyen desmosomas cortos, adherencias zonales y uniones comunicantes (Mitchell and Burghardt, 1986). Aquellos ovocitos que no son rodeados por células de la pregranulosa para formar el folículo primordial generalmente sufren apoptosis (Pesce and De Felici, 1994).

II. Foliculogénesis.

En esta etapa el crecimiento del ovocito está asociado a la maduración del folículo y puede dividirse en dos etapas, en la primera el crecimiento del ovocito es rápido y se correlaciona con el crecimiento del folículo, durante la segunda etapa no se observa crecimiento del ovocito mientras que el folículo incrementa su diámetro. Según la clasificación que en un principio fue propuesta para el ratón (Otsuka et al, 1984) y más tarde fue adaptada para el humano y otras especies (Gougeon, 1986), se pueden distinguir folículos primordiales, primarios, secundarios, antrales y preovulatorios. Cada uno de los folículos se desarrolla a través de estas diferentes etapas para finalmente ovular, después de lo cual los remanentes del folículo se transforman en el cuerpo lúteo (Richards, 1994; Adashi, 1994).

1). Folículo primordial. Son folículos pequeños sin crecimiento que consisten de un ovocito pequeño, rodeado de las células planas que constituyen la pregranulosa y una capa basamental. Los folículos primordiales se encuentran generalmente en la corteza externa del ovario y representan la poza de folículos de reserva. La estimulación de algunos de estos folículos primordiales determina que inicien su crecimiento, fenómeno conocido como reclutamiento inicial (Gosden et al, 1983). La estimulación de los folículos primordiales se realiza por un conjunto de factores todavía mal conocidos, que pueden ser tanto intraováricos como extra-ováricos y cuya acción no solo es estimuladora sino inhibidora de la actividad de los factores que mantienen a los ovocitos en reposo. Las células de la pregranulosa del folículo primordial reclutado también son estimuladas a dividirse mitóticamente (Hirshfield, 1989) al mismo tiempo que sufren una serie de cambios morfológicos convirtiéndose de células planas a las células cúbicas características de los folículos primarios. El incremento en el tamaño del ovocito es evidente hasta la formación del folículo primario (Tsafiriri, 1997). Al folículo con una sola capa de células cúbicas e la granulosa se le ha nombrado folículo primario. Sin embargo en ocasiones es verdaderamente difícil distinguir entre folículos primordiales y folículos primarios (Hirshfield, 1989) por lo que ambos se han considerado como un grupo contiguo (Gougeon, 1996).

1.1). *Influencia de la FSH en el reclutamiento inicial.* Se ha mencionado que el reclutamiento inicial no depende de gonadotropinas (Peters et al, 1973) y que la FSH y la LH no pueden tener acción directa sobre los folículos primordiales ya que no se ha podido demostrar en ellos la presencia de receptores a gonadotropinas (Oktay et al, 1997). Sin embargo, en ratas hipofisectomizadas se ha observado un claro descenso en el reclutamiento inicial de folículos cuando se compararon con los animales controles (Edwards et al, 1977; Wang and Greenwald, 1993a). También se ha demostrado que las células de la granulosa de los folículos primordiales pueden responder a activadores de la vía del AMPc con un incremento en la expresión de aromatasa y receptores a FSH (Ahmed et al, 1986) y con un incremento en la síntesis de DNA en los folículos preantrales semejante a la que se observa en los folículos antrales al ser estimulada por FSH (Roy and Greenwald, 1989).

Se ha observado, que algunos genes disminuyen su expresión de manera inversamente proporcional al desarrollo folicular, tal es el caso del gen "tumor de Wilms" (WT1) (Hsu et al, 1995). La expresión de WT1 reprime la actividad de los promotores de inhibina alfa y del receptor de FSH, otros genes esenciales para el desarrollo folicular, que aumentan su expresión al iniciar el reclutamiento (Chun et al, 1999). Estos hallazgos remarcan la importancia de la FSH en el reclutamiento inicial, así como de la participación de activadores endógenos de la vía del AMPc, tales como la norepinefrina, por lo cual los folículos que inician su desarrollo en el ovario de la rata serán muy probablemente los que están altamente involucrados cerca de la unión corticomedular (Mayerhofer et al, 1997).

Algunas proteínas como la activina y la inhibina están involucradas en el desarrollo folicular. Se ha demostrado que la activina A puede detener el crecimiento de folículos preantrales, manteniéndolos en arresto a pesar de que estos folículos sean expuestos a FSH. Sin embargo, en los folículos primordiales o primarios no se detectan mensajeros de inhibina Beta-A y/o Beta-B los cuales se observan por primera vez en los folículos secundarios (Mcunier et al, 1988). Es muy probable que los folículos vecinos de los folículos primarios secreten activina y faciliten la acción inhibitoria sobre los folículos primarios por vía parácrina (Mizunuma et al, 1999) y que una disminución local de la activina como resultado de la atresia de los folículos secundarios puede desencadenar la foliculogénesis temprana (Mizunuma et al, 1999). Sin embargo la activina A no modifica el efecto de la acción del factor intraovárico, esto es compatible con el concepto general de que el folículo primordial puede desencadenar su propio crecimiento como resultado de estímulos intraováricos (Tonetta and diZerega, 1989; Gougeon, 1996; Kumar et al, 1997).

1.2). *Participación del ovocito en el reclutamiento inicial.* Al ovocito se le ha atribuido un papel pasivo en el reclutamiento inicial (Tsafiriri, 1997). Sin embargo existen evidencias que indican lo contrario. Por ejemplo en las ratas se ha demostrado que la presencia de algunos factores producidos por el mismo ovocito, como el factor de diferenciación y crecimiento 9 (GDF-9), es necesaria para continuar con el desarrollo del folículo hasta la etapa primaria (Dong et al, 1996). Además el orden en el que los folículos primordiales son reclutados, depende del orden en el cual el ovocito entró a la meiosis en etapas perinatales (Edwards et al, 1977). Es también notable observar que las células de la granulosa son incapaces de formar folículos en ausencia de ovocitos (Merchant, 1975; Merchan-Larios and Centeno, 1981). Se ha propuesto que algunos factores que funcionan en la comunicación ovocito-granulosa puedan tener un papel importante en el reclutamiento inicial. Uno de estos factores es el conocido como LK, el cual se expresa en las células de

la granulosa en el momento del reclutamiento de los folículos primordiales, mientras que su receptor se encuentra localizado en el ovocito y en las células de la teca. Las mutaciones inducidas en el gen que determina la síntesis del LK, inhiben el desarrollo de los folículos primordiales y la formación de folículos primarios (Bedell et al, 1995). Así mismo el tratamiento de ratones neonatales con anticuerpos contra el receptor c-kit causa disturbios en el reclutamiento inicial (Yoshida et al, 1997).

2) Folículos secundarios o preantrales. En folículos secundarios, también conocidos como preantrales, medianos o en crecimiento, el ovocito continúa su crecimiento y las células de la granulosa por una serie de divisiones mitóticas dan origen a un folículo multilaminar que posee dos o tres capas de células de la granulosa. Aparece la zona pelúcida, se inicia la organización de la teca alrededor del folículo preantral y, por lo tanto, la formación de la red vascular del folículo (Hsueh et al, 1996).

2.1). Influencia del ovocito, de la granulosa y de la teca en el desarrollo del folículo preantral. El crecimiento del ovocito, desde el inicio de la foliculogénesis y en el transcurso de ésta, requiere de la presencia de un sistema de comunicación entre las células de la granulosa y el ovocito. Los ovocitos que son separados de las células de la granulosa no muestran crecimiento, mientras que los ovocitos en los que se mantienen las uniones comunicantes con las células de la granulosa crecen normalmente (Tsafirri, 1997). En esta etapa del desarrollo se expresa la conexina 37, una proteína característica de las uniones comunicantes, la falta de conexina 37 tiene un enorme impacto en el crecimiento del ovocito, mientras que el desarrollo folicular mismo puede realizarse normalmente hasta el estado secundario tardío y formar un limitado número de folículos antrales pequeños (Simon, et al, 1997).

La interacción ovocito-células de la granulosa también es necesaria durante esta fase para el reclutamiento de las células de la teca así como para su participación en el desarrollo folicular. Las células de la teca son reclutadas de células del estroma adyacente al folículo después de haberse iniciado el reclutamiento del folículo primordial (Peters, 1979). Este reclutamiento de las células de la teca puede ser, en parte, inducido por un factor derivado de las células de la granulosa que induce la organización de las células de la teca, actuando también sobre las células del estroma adyacentes para que proliferen y se diferencien a células de la teca (Peters, 1979). Posiblemente el ligando KL producido por las células de la granulosa pueda ser este factor de reclutamiento de la teca durante el desarrollo folicular temprano (Parrott and Skinner, 2000). Así mismo, los folículos preantrales secretan algunas otras proteínas que aumentan el crecimiento y diferenciación de la teca (Gelety and Magoffin, 1997).

2.2). Esteroidogénesis, gonadotropinas y factores de crecimiento en el desarrollo folicular preantral. A pesar de que se han encontrado receptores a FSH en las células de la granulosa desde el folículo primordial hasta el folículo preantral en crecimiento (Richards, 1980) y de que los folículos preantrales con 1-4 capas de células de la granulosa muestran un incremento en la síntesis de DNA (Roy and Greenwald, 1989) y en el diámetro folicular (Yokota et al, 1997) en respuesta a FSH, se acepta que los estadios tempranos del desarrollo folicular se realizan en ausencia de FSH (Tonetta and diZerega, 1989, Gougeon, 1996, Kumar et al, 1997) bajo la influencia de factores intraováricos (Tonetta and diZerega, 1989, Gougeon, 1996, Giuduce, 1992).

Estudios realizados utilizando folículos preantrales intactos de hámster adulto han demostrado que el folículo preantral, incluyendo folículos primarios pequeños con una simple capa de células de la granulosa y sin teca, son capaces de producir progesterona y androstendiona *in vitro* cuando se estimulan con FSH (Roy and Greenwald, 1987), pero que la producción de novo de estrógenos sólo es evidente para los folículos con 5 ó 6 capas de la granulosa y teca desarrollada (Roy and Greenwald, 1987). Esta respuesta esteroideogénica limitada podría ser debida a que los receptores a FSH no se encuentran adecuadamente acoplados al sistema de la adenilato ciclase o a que estos receptores no funcionan óptimamente puesto que se requiere de estrógenos para aumentar la producción de AMPc (Roy and Greenwald, 1987).

La participación simultánea de las células de la teca y de la granulosa en la esteroideogénesis quedan también demostrados por los estudios realizados en cultivos combinados de ambos tipos de células en los cuales la estimulación con FSH produce un aumento en la proliferación y en la esteroideogénesis, lo cual no sucede cuando se estimulan de la misma manera cultivos individuales de uno u otro tipo de células (Kotsuji and Tominaga, 1994). También se ha demostrado una interacción entre células de la granulosa y células de la teca en el desarrollo folicular a través del efecto de algunos esteroides sexuales como los andrógenos y los estrógenos (Wang and Greenwald, 1993b; Hillier et al, 1997; Murray et al, 1998).

La función normal de las células de la granulosa y su viabilidad dependen de la presencia de receptores funcionales para FSH sobre la superficie de la célula. Estos receptores a FSH están relacionados con el sistema de la AMP ciclase y la formación de AMPc (Knecht et al, 1984), el factor de crecimiento epidermal y la activina pueden modular los sitios de unión de FSH (May et al, 1987). La acción de la FSH se refleja, pues, en un incremento de AMPc el cual produce un aumento en la actividad de la aromatasas y la síntesis de estrógenos y, lo cual es particularmente importante, de un incremento en el número de receptores a gonadotropinas y sitios intracelulares de unión del AMPc (Richards, 1980).

En los folículos preantrales, así como en estadios posteriores del desarrollo folicular, las células de la granulosa son capaces de sintetizar péptidos bioactivos importantes para la regulación del funcionamiento del folículo, como la activina y la folistatina (Meunier et al, 1988). La síntesis de otro de estos importantes péptidos, la inhibina, está bloqueada en el estadio de desarrollo preantral por la expresión del gen WT1. Cuando se alcanza el estadio preovulatorio disminuye la expresión de WT1 y aumenta la formación de inhibina de una manera directamente proporcional al desarrollo folicular (Hsu et al, 1995; Goldring et al, 1987). La inhibina bloquea la liberación de FSH por la hipófisis, mientras que la activina la estimula (Findaly, 1993). La folistatina es estimulada por la activina, sin embargo cuando ésta se une a la subunidad beta de la activina es capaz de neutralizar la bioactividad de la activina (Shimonaka et al, 1991, Nakamura et al, 1992). La activina modula de varias maneras la producción de progesterona estimulada por FSH en células de la granulosa de ratas: en folículos preantrales y antrales tempranos, la activina aumenta su respuesta a FSH, pero en células de la granulosa de los folículos preovulatorios es inhibitoria (Miro et al, 1995). En células de la granulosa luteinizadas en cultivo, la activina inhibe la biosíntesis de progesterona y de estrógenos (Rabinovici et al, 1992).

Se ha demostrado el papel modulador importante de diferentes factores intraováricos con acción proliferativa y que son requeridos para el desarrollo folicular (Hirshfield, 1991), aunque se desconoce con precisión su mecanismo de acción sobre el

desarrollo y la maduración foliculares. Se ha reportado que la FSH es capaz de incrementar la síntesis del factor de crecimiento transformante alfa (TGF α) en la teca, (Kudlow, et al, 1987). También se ha encontrado actividad del factor de crecimiento epidermal (EGF) en células de la granulosa de folículos preantrales y antrales pequeños de Hámster y en células de la teca de ratas (Skinner et al, 1987; Roy and Greenwald, 1990). Usando (125 I)-EGF, se han encontrado sitios de unión en células de la granulosa y de la teca de folículos secundarios y terciarios (Chabot et al 1986). El EGF regula la producción de progesterona en folículos secundarios y terciarios (Roy and Greenwald, 1991a) y media la acción proliferativa de la FSH y del AMPc en las células de la granulosa. Esto último se ha demostrado porque la proliferación se bloquea con el uso de anticuerpos específicos para EGF (Roy and Greenwald, 1991b), además se ha encontrado que el EGF provoca la incorporación de timidina (3 H) al DNA de las células de la granulosa de folículos preantrales de hámster, lo cual refleja la acumulación de las células en la fase de síntesis del ciclo celular.

En los folículos preantrales se encuentran altos niveles del factor de crecimiento insulinoide uno (IGF-1) y sus receptores (Levy et al, 1992). Sin embargo, se ha observado desarrollo relativamente normal hacia el estado antral temprano en ratones mutantes a los que les falta IGF-1 (Baker et al, 1996); también se ha encontrado que sirve para aumentar la respuesta de células de la granulosa a FSH al aumentar la expresión de su receptor (Zhou et al, 1997), IGF-1 participa en la síntesis de andrógenos en las células de la teca de la rata al estimular el gen del citocromo P450 (sc) potencializando el efecto de la LH sobre la biosíntesis de andrógenos en las células de la teca (Magoffin et al, 1990). Otro factor de crecimiento que se localiza en los folículos preantrales es el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), el cual estimula la incorporación de timidina (3 H) en los folículos preantrales de hámster estimulando su crecimiento (Roy and Greenwald, 1991a). El factor de crecimiento fibroblástico FGF es secretado por las células de la teca y tiene acción parácrina sobre la granulosa (Parrott and Skinner, 1998).

3) Folículos Antrales. El folículo antral, consiste de diversas capas de células de la granulosa, un antro lleno de líquido folicular, una capa basamental que separa la teca interna de las células de la granulosa, las capas externa e teca interna que constituyen la teca y, por supuesto, el ovocito. Este es un estadio crucial para el desarrollo del folículo, la mayoría de estos folículos sufren atresia si no son rescatados por gonadotrofinas después del inicio de la pubertad (Hirshfield, 1991). Estos folículos miden entre 0.2 y 0.4 mm de diámetro en la rata (Hirshfield and Desanti, 1995), de 0.4 a 0.5 mm en las ovejas (Turbull et al, 1977) y entre 2 y 5 mm en la mujer (Gougeon 1996).

3.1). Compartimentalización de las células de la granulosa. Las células de la granulosa en los folículos antrales se organizan en regiones morfológicamente distinguibles con funciones especializadas. La capa de células de la granulosa adyacente al ovocito, células de la corona radiada, establecen contacto inmediato con el ovocito más allá del estado preovulatorio por medio de procesos membranales que atraviesa la zona pelúcida y forma el complejo de las uniones comunicantes con el oolema, estas células sirven de células "nodriza" dando nutrientes para el crecimiento del ovocito y también intercambiando factores reguladores con el ovocito, por medio de esta comunicación se liberan señales que se requieren para la maduración coordinada del folículo y del ovocito.

Las células del cúmulus forman una masa celular que rodea al ovocito, llamada cúmulus oophorus, que une al ovocito con la pared del folículo y pueden contribuir con sus necesidades de nutrición y de regulación. Después de la ovulación el complejo cúmulus-ovocito puede facilitar la captura por el oviducto y puede contribuir a la maduración final del ovocito y a la preparación de la célula espermática para la fertilización. La mayoría de células de la granulosa forman el muro o células de la granulosa parietal que tapizan la cavidad folicular. Estas células del muro adyacentes a la capa basamental son las primeras en diferenciar su respuesta esteroideogénica para realizar la aromatización de andrógenos y la síntesis de progesterona como respuesta a los picos ovulatorios de LH (Midgley, 1972), principalmente debido a que se inicia la expresión de la actividad de la 3-beta-hidroxi-esteroide deshidrogenasa (3-beta-HSD) (Zoller and Weisz, 1979) y a la presencia de niveles importantes de citocromo P450 (Zoller and Weisz, 1978). Las subpoblaciones de células de la granulosa pueden ser explicadas con base a sus diferentes sensibilidades a FSH (Kasson et al, 1985).

3.2). *Reclutamiento cíclico y selección de folículos antrales.* El desarrollo folicular puede continuar independientemente de la secreción de gonadotropinas, pero solo hasta el estado antral temprano, después de esta etapa se requiere la presencia de gonadotropinas, probablemente para determinar la inhibición, o el rescate, de la atresia de los folículos antrales después del inicio de la pubertad (Hirshfield, 1991). Los folículos antrales tempranos miden 0.2-0.4 mm de diámetro en la rata (Hirshfield and Desanti, 1995), mientras que en las ovejas miden de 0.4-0.5 mm (Turbull et al, 1977) y en el humano miden de 2-5 mm (Gougeon, 1996). En la mujer aproximadamente a las 24 semanas de la gestación ya se han formado los folículos primarios y a las 26 semanas de la vida intrauterina algunos folículos han alcanzado ya la etapa secundaria de desarrollo (McGee and Hsueh, 2000). En la rata el desarrollo folicular se inicia entre los días 2-3 post parto, llega a la formación de un folículo multilaminar cerca del día 6-7 y alrededor del día 10 se observan folículos que contienen antro (McGee and Hsueh, 2000). A pesar de que la atresia puede presentarse en cualquier fase del desarrollo folicular, en la rata este fenómeno es bien aparente solo hasta el día 18 cuando aumenta el número de folículos antrales (McGee et al, 1998).

El rescate de los folículos antrales se conoce como reclutamiento cíclico y es iniciado por la presencia de la FSH. Este paso, conocido también como mecanismo de selección, es un proceso por el cual algunos folículos inician su desarrollo (Rombauts et al, 1998). Para que se realice el proceso de reclutamiento es necesario que la teca exprese los RNAm de P450 scc, mientras que en las células de la granulosa se requiere de la expresión del RNAm del receptor de FSH (FSHR) y de los citocromos P450 scc y P450 arom. Un poco más adelante en el proceso de maduración folicular, se requiere de la expresión del RNAm para el receptor de LH (LHR) en las células de la granulosa y en la teca, así como la expresión de la 3-beta-HSD (Xu et al, 1995).

3.3). *Participación de FSH en el desarrollo del folículo antral.* Se ha determinado que la disminución de gonadotropinas en el suero después de la hipofisectomía a ratas, conduce a la atresia de los folículos antrales (Nahum et al, 1996), mientras que tratamientos con FSH a folículos antrales en cultivos previene el inicio espontáneo de la atresia folicular (Chun et al, 1996). LH y hCG solos son inefectivos para evitar la atresia, sugiriendo que FSH es el factor de supervivencia en este estado del desarrollo folicular (Chun et al, 1996). Dentro del ciclo estral existen fluctuaciones de FSH sin embargo en roedores,

caracterizados por una fase lútea corta durante su ciclo estral, el incremento en FSH periovulatorio parece ser requerido para que escape de la atresia y continúe con su desarrollo listo para ovular en el siguiente ciclo estral (Hirshfield, 1988). En los rumiantes domésticos, con una fase folicular corta, la oleada de folículos son seleccionados por incrementos transitorios en los niveles de FSH durante la fase lútea (Scaramuzzi et al, 1993).

En la oveja se requiere de altos niveles de FSH y niveles basales de LH como señal para el reclutamiento y la selección folicular (Driancourt, 1991). Durante el ciclo estral ovino, la concentración en el suero de FSH incrementa y disminuye a intervalos regulares (AMPbell et al, 1991; Ginther et al, 1995) y existe una relación temporal entre el reclutamiento folicular y los incrementos en la concentración de FSH en el suero (Ginther et al, 1995). Así mismo, en el anestro de las ovejas se observa un desarrollo de folículos antrales muy similar al que se encuentra en la fase lútea de acuerdo a datos que se obtuvieron de ovejas en anestro, originados de estudios postmortem de tractos reproductivos (Hutchinson and Robertson, 1966; Brand and de Jon, 1973) y de experimentos con laparoscopia-endoscopia (Noel et al, 1993). El anestro está asociado con altos niveles de FSH y una reducción en la frecuencia LH hasta 2.4/9h, comparados con los valores basales del proestro que es de 5.3/9h (Greenwald and Roy, 1994).

3.4. Participación de enzimas con actividad proteolítica en el desarrollo de folículos antrales. La actividad antiproteolítica y proteolítica parece ser también importante en la regulación del desarrollo folicular, la actividad antiproteolítica es mayor en los folículos antrales pequeños de la cabra, y disminuye con el tamaño folicular por un lado y por el otro la actividad proteolítica aumenta con el tamaño folicular (Rosales et al, 1990). La actividad antiproteolítica inhibe la actividad estimuladora de la adenilato ciclasa provocada por LH y por FSH (McLlroy et al, 1980); principalmente al inhibir la síntesis de AMPc por las gonadotropinas (Richert and Ryan, 1977). La actividad antiproteolítica y proteolítica participa en la remodelación tisular no solo antes de la ovulación, sino durante las fases del crecimiento y maduración folicular (Rosales et al, 1990).

La actividad de la enzima lisosomal, fosfatasa ácida de las células de la granulosa también participa en las etapas tempranas de desarrollo folicular, ya que se encuentra una gran actividad total de esta enzima en células de la granulosa de los folículos antrales tempranos y disminuye con el desarrollo folicular (Ballesteros et al, 1992). La fosfatasa ácida puede bloquear la unión de los esteroides con su receptor a través de su actividad defosforilante, puesto que los receptores son proteínas fosforiladas (Dougherty et al, 1982); una disminución de la actividad total de la fosfatasa en forma directamente proporcional al desarrollo folicular favorece un aumento en la unión del receptor a estrógenos y una disminución de la atresia folicular (Rosado y Rosales 1991).

4). El folículo preovulatorio o folículo de Graf. adquiere su máximo diámetro y responde a los picos preovulatorios de gonadotropinas. Se requiere de la expresión de RNAm para receptores de LH (LHR) en células de la granulosa y teca necesaria para la dominancia del folículo (Bao et al, 1997).

4.1). Participación de las gonadotropinas en la dominancia folicular. En la vaca (Gong et al, 1993) y en la oveja (Ginther et al, 1995) se han encontrado evidencias que el reclutamiento cíclico está asociado con incrementos de FSH, y que periodos de dominancia

folicular están asociados con niveles basales de FSH. En experimentos en los que se ha suprimido la liberación de gonadotropinas demuestran que FSH por sí sola puede estimular el reclutamiento cíclico (Picton et al, 1990; AMPcbell et al, 1998) y que el folículo dominante depende en un inicio de FSH y LH para finalmente solo requerir de altos niveles de LH (Scaramuzzi et al, 1993; AMPcbell et al, 1995; AMPcbell et al, 1999). Después de la luteólisis e iniciar la fase del metaestro del ciclo estral aumentan los niveles de LH, siendo éste el factor biológico que controla el surgimiento del folículo dominante (Greenwald and Roy, 1994).

Las células de la granulosa de los folículos preovulatorios producen estrógenos, esta producción está regulada por FSH/LH, P450 arom, se han detectado en células de la granulosa de folículos de muchas especies la expresión de RNAm y proteínas para el receptor de FSH/LH, P450 arom (Bao et al, 1997, Doody et al, 1990). Mientras que en la células de la teca se requiere de la expresión de receptor de LH, P450 scc, p450 c17, 3 beta-HSD y de StAR, para la síntesis de andrógenos, necesarios para el sustrato en la síntesis de estrógenos en las células de la granulosa, la expresión de RNAm de StAR es baja en la teca de los folículos antrales y preantrales, mientras que se incrementa su expresión en la teca durante la dominancia del folículo (Bao et al, 1998).

El folículo dominante en la oveja muestra actividad significativa de las 3 beta-HSD en la teca mientras que esta enzima no está presente en la membrana de la granulosa hasta pocas horas antes de la ovulación (Hay and Moor, 1975). Sin embargo histoquímicamente se ha demostrado que la actividad de la 3 beta-HSD en el ovario de la rata está fuertemente expresada en células de la granulosa de folículos preovulatorios y solo se encuentra débilmente expresada en estadios antrales tempranos (Hoyer and Anderson, 1977).

4.2. Participación de gonadotropinas y de enzimas en la ovulación del folículo preovulatorio. Se ha demostrado que LH y hCG promueven la labilización de los lisosomas en células del ovario, permitiendo la liberación de sus enzimas hacia el citoplasma de las células (Rahi and Srivastava, 1984), así mismo, se incrementa en el número de lisosomas (Elfont et al, 1977). Sin embargo otros datos demuestran que la LH y hCG actúan selectivamente sobre las células de la teca, puesto se ha observado un aumento de la actividad total de fosfatasa ácida y glucosaminidasa en la teca de los folículos preovulatorios de cabras, mientras que los lisosomas de las células de la granulosa no muestra cambios en su actividad en los fliculos preovulatorios (Ballesteros, et al, 1992).

Las gonadotropinas pueden inducir la ovulación al estimular al activador del plasminógeno en folículos preovulatorios de ovarios maduros. El activador del plasminógeno actúa sobre el plasminógeno en el fluido folicular y tejido del ovario para producir plasmina, que en turno, debilita la pared del folículo (Strickland and Beers, 1976). Así mismo la actividad de tripsina de la teca de los folículos preovulatorios es necesaria para la ovulación (Rosales et al, 1990). La proteasa liberada dentro del tejido conectivo puede activar la colagenasa latente de la matriz extracelular (Morales et al, 1983), esta acción local puede alterar la estructura del folículo y facilitar su ruptura (Rosales et al, 1990).

Si la señal ovulatoria no se presenta, los folículos sufren degeneración, este es el mecanismo a través del cual muchos de los folículos son eliminados en el conejo (Perry and Rowlands, 1962) y por el cual los folículos de la primera oleada de crecimiento son eliminados en los rumiantes como la oveja y la vaca (McNatty et al, 1992).

4.3). *Participación de factores de crecimiento en los folículos preovulatorios.* Los factores de crecimiento participan en el desarrollo folicular desde el folículo preantral, antral y preovulatorio. En los folículos preovulatorios, numerosos factores promueven la supervivencia de las células del folículo (Chun, et al, 1994, Eisenhauer et al, 1995, Chun, et al, 1995). Un elaborado mecanismo de control intrafolicular aumenta la supervivencia del folículo preovulatorio (Hsueh et al, 1996). El inicio de la apoptosis en los folículos preovulatorios en cultivos libre de suero es prevenida por tratamientos de FSH y LH (Chun, et al, 1994), los factores locales que incluyen IGF-I, EGF, TGF α y Factor de crecimiento fibroblástico-2 también suprimen la apoptosis de las células del folículo (Chun, et al, 1994, Tilly et al, 1992). La interleucina-1 β también es un factor de supervivencia del folículo preovulatorio (Chun, et al, 1995).

4.4). *Diferenciación de las células de la granulosa en el estado preovulatorio.* En el ovario adulto, las células que producen esteroides comprenden a las células de la teca y células de la granulosa de folículos grandes, el cuerpo lúteo, y células intersticiales. Una célula típica de producción de esteroides se caracteriza por tener muchas mitocondrias con crestas tubulares, abundante retículo endoplásmico liso, y muchas gotas de lípidos. (Christensen, 1975), estas características ultraestructurales son muy evidentes en células de la granulosa de folículos que van a ovular (Mestwerdt, 1977), antes de aparecer la señal ovulatoria en muchas especies (Bjersing, 1978).se observan características típicas de luteinización, como incremento en el retículo endoplásmico liso y la aparición de mitocondrias con crestas tubulares.

La marca predominante de diferenciación de las células de la granulosa de aves es el desarrollo de un componente de la vía de trasducción de la señal que regula la biosíntesis de esteroides principalmente la producción de progesterona la diferenciación esta regulada en respuesta al estímulo de gonadotropinas (LH). Usando citometría de flujo se han observado diferentes características de las células de la granulosa de folículos individuales de folículos proovulatorios de aves. Durante los días finales de la maduración folicular hay un incremento en el tamaño de la célula y una actividad metabólica general (contenido de proteína y RNA) y un descenso en la proliferación en las células de la granulosa (Marrone and Crissman, 1988). Hay un marcado incremento en la actividad enzimática esteroidogénica en las células de la granulosa durante la maduración folicular (Asem and Hertelendy, 1985).

Una relación entre la estructura de las células de la granulosa y su función durante la diferenciación se han sugerido de varios reportes (Soto et al, 1986; Carnegie and Tsang, 1988) principalmente cambios en la forma de las células, lo cual involucra la reorganización del citoesqueleto y redistribución de organelos, esto parece ser una importante respuesta al estímulo que induce la esteroidogénesis. Los organelos que interviene en la esteroidogénesis incluyen a la mitocondria y al retículo endoplásmico, que contiene las enzimas esteroidogénicas; gotas de lípidos, que almacenan al sustrato colesterol; y a los lisosomas que procesan el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad. Un aumento en el número de mitocondrias durante la maduración folicular aparece ser un evento morfológico asociado con la diferenciación de las células de la granulosa de aves (Dive et al, 1992).

III. Atresia folicular.

En los mamíferos hay al menos seis olas de degeneración que ocasiona la pérdida masiva de células germinales durante el desarrollo folicular, las primeras tres ocurren antes de la formación del folículo, así que comprende básicamente la degeneración de células germinales, mientras que las otras tres etapas, se presentan en las distintas fases del desarrollo folicular (Mariana et al, 1991) y está relacionado con la atresia, sin embargo el mecanismo exacto y el control de la atresia permanecen poco claros, En muchas especies, el porcentaje de folículos atrésicos es alto cuando se incrementa el diámetro folicular en los folículos preantrales (McNeilly et al, 1986). Mientras que todos los folículos antrales tempranos sufren atresia en etapas prepúberales, en los animales adultos es más común observar que las gonadotropinas no rescaten en su totalidad a los folículos en el penúltimo estadio del desarrollo folicular (Hirshfield, 1991; Kaipia and Hsueh, 1997). La proporción de folículos atrésicos y de los folículos sanos es moderadamente constante durante la vida fértil, pero varía entre especies, en la rata, el 70% de los folículos antrales son atrésicos (Mandl and Zuckerman, 1950), en el ratón, 50% (Jones 1956), en el conejo, el 60% (Pincus and Enzmann, 1937), en el humano varía entre el 50-75% (Block, 1951), en la oveja, el 60% (Turnbull et al, 1977), en el cerdo, el 56% (Centola, 1982). Los folículos menos susceptibles a experimentar atresia son los preantrales y preovulatorios (Hirshfield, 1991; Tilly et al, 1991).

Durante el desarrollo folicular en el ovario, solo un número limitado de folículos es capaz de llegar a la ovulación mientras que la gran mayoría experimenta atresia. En la mujer al momento del nacimiento se observa un número aproximadamente 2×10^6 de ovocitos, este número disminuye de manera tal que al llegar a la pubertad sólo están presentes de 300,000 a 400,000 folículos en los ovarios, de esta dotación fija de folículos solo 400 serán ovulados durante el transcurso de toda su vida reproductiva, lo que representa que solo el 0.01 % de los folículos son seleccionados para ovular, mientras el 99.9 % sufren atresia (Tsafriri and Braw, 1984; Hirshfiel, 1991; Tilly et al, 1991; Hsuch et al, 1996; McGee et al, 1998; Hsu and Hsueh, 1998). Uno de cada 500 folículos presentes al momento del nacimiento serán ovulados, el resto sufrirán atresia lo que hace a este proceso parte integral de la función ovárica normal (Rotello et al, 1989). Para las demás especies de mamíferos también la gran mayoría de folículos presentes en el ovario experimentan atresia y varía de entre 70 al 99.9% de acuerdo a la especie (Ryan y Lee, 1976).

1. Teorías de la atresia.

Por lo menos tres modelos teóricos pueden ser propuestos para explicar como se determina el destino de los folículos, el cual puede ser, la ovulación o la atresia. (Hsueh et al, 1994).

a).- Los folículos que sufren atresia pueden estar predestinados por deficiencias inherentes al ovocito, las células foliculares o por su ambiente inmediato. Como la mayoría de los folículos son capaces de crecer bajo apropiada estimulación hormonal, este mecanismo no parece ser la base para la atresia de la mayoría de los folículos.

b).- La mayoría, si no es que todos los folículos son capaces de llegar a la ovulación a menos que la atresia se dispare por estímulos atresiogénicos.

c).- El destino final de todos los folículos es la atresia. Sólo los folículos que alcanzan un estado específico de desarrollo que coincida con señales hormonales críticas, son dispensados de la atresia.

2. Clasificación de la atresia.

El funcionamiento de los ovarios, desde el punto de vista del desarrollo folicular se caracteriza por el continuo crecimiento y degeneración de los folículos de los cuales solo unos cuantos de ellos son seleccionados para ovular (Rosales y Rosado, 1989; Hirshfiel, 1991) por lo que parecería posible llegar a la conclusión que el destino final del desarrollo folicular es la atresia (Murdoch, 1992). En condiciones naturales, la atresia, es un proceso paulatino e irreversible, cuyas alteraciones morfológicas del folículo dependerán del grado alcanzado. Desde el punto de vista histológico se han propuesto varias maneras de clasificar la atresia folicular, de las más utilizadas en la actualidad es la propuesta por Carson et al, (1979), que es una modificación a la designada por Byskov (1974), en la cual se encuentran 5 grados de atresia los cuales comprenden:

Atresia I: Involucra a los folículos no atrésicos, los cuales presentan una capa de la granulosa íntegra y uniforme. Las tecas son evidentes y están en contacto con la granulosa. La membrana basal está íntacta. No hay células con núcleos picnóticos en la granulosa, o bien son muy escasos (< 5% al examinar un corte sagital hecho por los diámetros mayores del folículo).

Atresia II: Se encuentran algunas áreas discontinuas en la granulosa, provocadas por el desprendimiento de algunas células y presenta un porcentaje importante (5-20%) de células con núcleos picnóticos o fragmentado localizados adyacentes a la cavidad antral. La membrana basal se conserva íntacta.

Atresia III: Las perforaciones de la capa de la granulosa están asociadas con extensas áreas de núcleos picnóticos de esta capa. Se observa un número de leucocitos extravazados, lo cual se correlaciona con el rompimiento de la membrana basal. En esta etapa es posible demostrar la presencia de linfocitos T citotóxicos en la pared folicular (Bukovsky et al, 1984). Frecuentemente se observa hipertrofia de la teca (Guraya and Greenwald, 1964).

Atresia IV: Se perfora la capa de la granulosa, además de una separación parcial de la teca interna. Los núcleos picnóticos son evidentes en ambas capas, a pesar de que el número total de células con núcleos picnóticos es menor que en el estado anterior, probablemente a causa de la fagocitosis de las células degeneradas por los macrófagos. El ovocito inicia su separación de la pared folicular.

Atresia V: Los fragmentos residuales de la granulosa están totalmente separados de la teca. Los capilares de la teca y el ovocito han desaparecido. El folículo se encuentra encogido y puede haber colapso total de las paredes, aparentemente debido a la contracción de tejido muscular liso que han sido descrito en la teca (Mota and Familiari, 1981).

2.1. Cambios morfológicos y bioquímicos observados durante la atresia.

La atresia sigue dos patrones diferentes durante el desarrollo folicular: en los folículos preantrales involucra cambios degenerativos que inician en el ovocito y continúa hacia las células de la granulosa, mientras que el ovocito tiene una resistencia al proceso degenerativo en los folículos en los que ya se ha formado el antro folicular (Tilly et al, 1995a; Greenwald and Terranova, 1988).

La atresia folicular inicia con la presencia de núcleos picnóticos en las células de la granulosa (Hay et al, 1976; Hishifield and Midgley; 1978; Byskov, 1978), en los folículos que se consideran sanos existe un número menor al 10% de células de la granulosa con núcleos picnóticos que se localizan cerca del antro folicular (Byskov, 1974), cuando inicia

la atresia se observa entre 10-30% de las células de la granulosa que muestran núcleos picnóticos (Hirshfield, 1989). Al mismo tiempo se observa una reducción o ausencia de la incorporación de timidina (^3H) dentro de las células de la granulosa lo que significa una reducción de células en la fase de síntesis del ciclo celular (Byskov, 1974; Hishifiel and Midgley, 1978; Hirshfield, 1989; Greenwald, 1989). La FSH puede estimular la síntesis de ciclina D en los folículos sanos (Sicinski et al, 1996), mientras p53 se manifiesta y mantiene en arresto a las células de la granulosa en la fase G1/S e inicia la apoptosis lo cual disminuye el número de células en la fase de síntesis del ciclo celular (Kim et al, 1999). En las células de la granulosa de folículos atrésicos, está presente la forma activa de la endonucleasa dependiente de $\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$ mientras que la endonucleasa inactiva se encuentra en los folículos sanos (Zeleznik et al, 1989; Boone et al, 1995; Boone and Tsang, 1997). La caspasa 3 se encuentra activada en los folículos atrésicos (Boone and Tsang, 1998; Van Nassauw et al, 1999) mientras que en los folículos sanos se encuentra inactiva como procaspasa-3 (Robles et al, 1999).

En todas las especies estudiadas, la atresia se correlaciona con un descenso en la síntesis de estrógenos y un incremento en la producción de progesterona. (Uilenbroek et al, 1980; Terranova, 1981; Maxson et al, 1985), esto es como consecuencia de la disminución en la expresión de RNAm para la aromatasas y receptores a gonadotropinas (Tilly et al, 1992) este descenso en la expresión de RNAm de aromatasas no es el resultado de un descenso total de la síntesis de RNA en los folículos atrésicos, puesto que los niveles de RNA ribosomal no disminuye (Hsueh et al, 1994). La disminución en la cantidad de estrógenos se ha atribuido también a un descenso en la actividad de la C17,20- liasa de la teca, lo que conduce a un descenso de andrógenos que pueden ser aromatizados en las células de la granulosa (Tsafiri and Eckstein, 1986; Tsonis et al, 1984). Otros estudios donde se observa el comportamiento de la proteína reguladora esteroideogénica (StAR), que importa colesterol de la membrana mitocondrial externa a la membrana mitocondrial interna (Stocco and Clark, 1996) necesaria para proveer el colesterol a la mitocondria para el metabolismo de la pregnenolona (Miller, 1988), esta proteína aumenta su expresión en las células de la granulosa y disminuye en células de la teca durante el progreso de la atresia lo que explica la síntesis de progesterona en estas células durante la atresia (Bao et al, 1998) aunado a la expresión de la 3-beta-HDS en las células de la granulosa de los folículos atrésicos requerida para el metabolismo de la progesterona (Breitenecker et al, 1978). Las células de la granulosa durante la apoptosis muestran una reorganización de los filamentos de actina que forman una red esférica que separa los organelos de las células de las áreas en que se están formando las vesículas apoptóticas en la membrana plasmática (Pitzer et al, 1996), así las células de la granulosa no pierden sus organelos que intervienen en la esteroideogénesis como la mitocondria, retículo endoplásmico liso, lisosoma y gotas de lípidos. Esta compartimentalización de los organelos esteroideogénicos alrededor de la región perinuclear permite el metabolismo de progesterona en las células de la granulosa apoptóticas hasta el colapso total (Pitzer et al, 1996). Algunas observaciones indican que existe una elevación temporal de la esteroideogénesis después de la inducción de atresia folicular (Miro and Hillier, 1996). Durante la apoptosis parece estar confinada la actividad multicatalítica a una área denominada proteosoma, que está presente en las células de la granulosa (Leibovitz et al, 1995), este proteosoma es trasladado al espacio donde se encuentran las burbujas de la membrana citoplásmica (Pitzer et al, 1996), esta traslocación protege al aparato esteroideogénico localizado en la región perinuclear de la degradación por el apoptosoma (Amsterdam and Selvaraj, 1997).

Se observa un descenso marcado de la vascularidad del folículo antes del colapso de la capa de la granulosa. (Murdoch, 1992). Anteriormente se pensaba que la atresia era el resultado de una suplementación sanguínea inadecuada (Greenwald, 1989; Hay et al, 1976), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre el gasto sanguíneo del folículo normal y los folículos en etapas tempranas de atresia (Bruce y Moor, 1976).

Las células de la granulosa degeneran y se separan de la capa basamentada en los estados avanzados de la atresia (Hay et al, 1976; Hirshfield and Midgley, 1978; Junqueira et al, 1989; Rajakoski, 1996), se fragmenta la lamina basal (Bagavandoss et al, 1983); mientras que en los estadios finales de la atresia se observa una reducción del número de las células de la granulosa (Hill and White, 1933, Bomsel-H. et al, 1979; McNatty et al, 1979). Los residuos de ácido siálico de los glicoconjugados que se exponen durante la atresia (Kimura et al, 1999) regulan negativamente la adhesión celular (Hoffman and Edelman, 1983, Rutishauser et al, 1988) y pueden jugar un papel importante en la separación de la capa de las células de la granulosa en los folículos atrésicos (Kimura et al, 1999). La reducción del número de las células de la granulosa es la consecuencia de la fagocitosis de las células de la granulosa apoptóticas por las células vecinas viables y por macrófagos (Hsueh et al, 1994, Gaytan et al, 1998). Los sistemas de reconocimiento de azúcar como la interacción entre azúcares específicos de las membranas de las células apoptóticas y su receptor tipo lectina en la membrana citoplásmica de las células fagocíticas, son uno de los mecanismos clave de reconocimiento de las células apoptóticas (Savill et al, 1993), aunque el mecanismo de reconocimiento de la célula apoptótica es específico para cada tipo celular, existen múltiples métodos de reconocimiento, en las células de la granulosa las glicoproteínas como Sia-alfa-2,6Gal/GalNAc que se localiza en la membrana citoplásmica de las células de la granulosa de los folículos atrésicos, y que está ausente en los folículos sanos (Kimura et al 1998a, Kimura et al, 1998b), puede estar involucrada en el reconocimiento de las células de la granulosa por las células fagocíticas (Kimura et al, 1999). Mientras que las células sanas pueden reconocer a las células muertas al expresar receptores como los de fagocitosis clase B tipo 1 (SR-B1) que normalmente tiene una alta afinidad a lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Acton et al, 1996; Rigotti et al, 1997; Kozarsky et al, 1997) y participan en la importación selectiva del colesterol HDL (Acton et al, 1994; Acton et al, 1996; Murao et al, 1997; Fluiter et al, 1998). SR-B1 se encuentra en los sitios donde se utiliza colesterol necesario para el metabolismo de esteroides, como la glándula adrenal, el ovario, el testículo, e hígado (Landschulz et al, 1996, Johnson et al, 1998). SR-B1 y otros miembros de la familia de receptores de fagocitosis están involucrados en la defensa del huésped contra patógenos exógenos así como en el reconocimiento de moléculas dañadas y células apoptóticas (Ren et al, 1995; Franc et al, 1996; Krieger, 1997; Suzuki et al, 1997; Terpstra et al, 1997; Murao et al, 1997). Puesto que SR-B1 puede unirse a los fosfolípidos aniónicos (Rigotti et al, 1995) y a que en la apoptosis se expone la fosfatidilserina un fosfolípidos aniónicos sobre la superficie de las células puede participar en el reconocimiento de las células apoptóticas (Fadok et al, 1992, Savill et al, 1993). Durante el desarrollo normal SR-B1 se expresa más en las células de la teca que en las otras células foliculares (Landschulz et al, 1996, Johnson et al, 1998, Mizutani et al, 1997, Li et al, 1998). Esto indica que SR-B1 tiene un papel importante en la incorporación de colesterol HDL para la producción de hormonas en estos tejidos. En la atresia se incrementa la expresión de SR-B1 en las células de la teca y puede estar participando en el reconocimiento de las células de la granulosa que muestran apoptosis por células sanas que no están especializadas en la fagocitosis (Svensson et al, 1999).

Las células de la teca muestran hipertrofia extensa durante la atresia en humano, rata, y conejo (Erickson et al, 1985), en ovinos, la teca muestran degeneración similar a la granulosa en estados avanzados de la atresia (O'Shea et al, 1978), las células de la teca de los folículos de hámster no muestran cambios morfológicos marcados a pesar de ocurrir una reducción de la vascularidad folicular y del colapso total de la granulosa (Greenwald, 1989). El destino final de las células de la teca durante la atresia varía entre la diferentes especies, en las ratas las células de la teca pueden dar origen a las células intersticiales secundarias (Erickson et al, 1985)., mientras que en el conejo y en la oveja los folículos atrésicos desaparecen dentro de 7 días (Hill and White, 1933).

El ovocito experimenta cambios meióticos en etapas tardías de la atresia folicular. (Hirshfield, 1989 Byskov, 1974), el ovocito muestra rompimiento de la vesícula germinal por lo que se ha denominado pseudomaduración (Erickson et al, 1985), muy probablemente como resultado de los cambios en la señal de las células de la granulosa y a una disminución de la proteína conesin 43 de las uniones comunicantes (Wiesen and Midgley, 1994). La respiración de un ovocito morfológicamente normal que proviene de un folículo atrésico es muy similar al de los ovocitos de las folículos sanos, lo cual está indicando que aun en la atresia el ovocito no experimenta cambios degenerativos (Magnusson et al, 1983), incluso los ovocitos de ovejas y de ratas tomados de folículos atrésicos pueden ser fertilizados *in vitro* y son capaces de mostrar desarrollo embriológico, similar a los sanos (Tsafriri and Braw, 1984). La degeneración del ovocito ocurre en etapas tardías de la atresia (Driancoura, 1991).

3. Vías privadas de inducción de la atresia.

El estudio de la atresia en los ovarios de los mamíferos, se ha centrado en el comienzo de la vía de trasducción de la señal y los efectores que activan el inicio de la muerte apoptótica, hasta ahora se conoce poco relativamente de los componentes intracelulares y eventos involucrados en este proceso (Tilly et al, 1995a; Tilly, 1996; Kaipia and Hsueh, 1997). La apoptosis celular en los folículos del ovario es regulada por hormonas de la hipófisis, así como por factores de crecimiento, citocinas y esteroides (Billig et al, 1993; Hsueh et al, 1996). Muchos de estos factores son importantes para mantener la proliferación celular y para mantener la viabilidad celular.

3.1. Gonadotropinas y factores de crecimiento en la atresia.

Algunos estudios han demostrado que las gonadotropinas suprimen la apoptosis de las células de la granulosa en condiciones *in vitro* de los folículos preovulatorios (Byaskov, 1978, Billig et al, 1994, Chun et al, 1994, Hirshfield and Nidgley, 1978, Schwartz, 1974). Experimentos *in vivo* también han confirmado que los folículos antrales destinados a sufrir atresia (Hsueh et al, 1994), pueden ser rescatados en una fase temprana por gonadotropinas exógenas (Braw and Tsafriri, 1980, Hay et al, 1976) o pueden ser rescatados de la atresia por FSH endógena (Tilly et al, 1991, Chun et al, 1996) así mismo la adquisición de receptores a FSH es esencial para la diferenciación y para la maduración del folículo (Adashi, 1994); sugiriendo que FSH y LH son hormonas importantes en este proceso. La atresia folicular se ha asociado con un descenso en la respuesta a FSH y a una reducción en los niveles del RNAm para el receptor de FSH (Tisdall et al, 1995, Xu et al, 1995b, Tilly et al, 1992).

Las células de la granulosa sintetizan péptidos bioactivos, que afectan la liberación de FSH de la hipófisis, la inhibina es un heterodímero formado por dos subunidades una alfa y otra beta (Amsterdam and Selvaraj, 1997) mientras que activina es una proteína que se considera un homodímero formado por dos subunidades beta (Cataldo et al, 1994), finalmente la folistatina es una simple cadena polipeptídica que puede unirse a inhibina y activina en la subunidad beta y neutralizar su actividad (Amsterdam and Selvaraj, 1997)

La primer función identificada de la activina A producida en las células de la granulosa es estimular la liberación de FSH de la hipófisis (Ying, 1988) así como estimular la formación de receptores a FSH en la hipófisis (Hasegawa et al, 1988; Xiao et al, 1992) e incrementando los niveles de RNAm para FSH (Xiao et al, 1990; Miro et al, 1991). En células de la granulosa la activina A aumenta la actividad de la aromataasa inducida por FSH (Hutchinson et al, 1987; Miro et al, 1991), El número de sitios de unión a LH (Sugino et al, 1988), la producción de progesterona (Hutchinson et al, 1987; Sugino et al, 1988) y el RNAm de folistatina (FS) (Michel et al, 1992).

La administración sistémica de activina A, en monos, puede perturbar la foliculogénesis (Stouffer et al, 1993), la activina A pueda tener una acción atretogénica sobre el desarrollo folicular de acuerdo a estudios *in vivo* usando ratas de 25 días de edad (Woodruff et al, 1990). En otros modelos celulares, la activina A, se ha reportado induce muerte celular en los mielomas (Nishihara et al, 1993), mientras que la sobre expresión de Bcl-2 suprime la apoptosis inducida por activina en otros modelos celulares (Koseki et al, 1995). Sin embargo la posible interacción entre Bcl-2 y activina en la regulación de la apoptosis de células de la granulosa no se ha establecido (Amsterdam and Selvaraj, 1997).

El efecto inhibitorio de folistatin sobre la activina A se observa con más claridad en los ovarios de ovejas que muestran cambios en la expresión de RNAm para folistatina y activina durante la maduración folicular y atresia (Braw-Tal, 1994). Interesantemente, la expresión de RNAm de folistatina en células de la granulosa de folículos sanos es muy alta y se localiza una acumulación mayor en células de la granulosa que forman el cúmulo, comparadas con las células más cercanas a la capa basamental del folículo sano (Braw-Tal, 1994). Sin embargo, durante la atresia folicular, los niveles de RNAm para folistatina en las células de la granulosa declinan y aumentan los de activina, finalmente desaparecen folistatina cuando progresa la atresia, persistiendo solo en las células del cúmulo (Braw-Tal, 1994). Por otro lado otras condiciones que pueden contribuir a la compartimentalización de la muerte celular en el folículo, que se han observado, que la cantidad de células de la granulosa que mueren es mayor en la capa de la granulosa que da al antro folicular comparada con las células que están hacia la capa basamental del folículo, mientras que la apoptosis no ocurre en las células de la granulosa del cúmulo (Yang and Rajamahendran, 2000), podría explicarse a demás de la diferente expresión de folistatin a su diferente actividad esteroideogénica de las células de la granulosa de bovinos principalmente entre las células de la granulosa del antro contra las del muro (Rouillier et al, 1996), además se ha sugerido que la capa basamental folicular juega un papel importante en transmitir señales de supervivencia y así prevenir la apoptosis de estas células que se encuentran más cercanas a esta (Amsterdam et al, 1998)

La inhibina puede funcionar como una proteína supresora de tumores ya que se ha observado que ratones que no producen inhibina-alfa desarrollan tumor en el estroma del cordón sexual ganadal (Matzuk et al, 1992), las células del tumor gonadal de los ratones deficientes en la inhibina-alfa no se multiplican al compararlas con las células de tumor ganadal de ratones deficientes en inhibina-alfa y p53 que proliferan rápidamente (Shikone

et al, 1994), lo cual sugiere que la inhibina-alfa bloquea a p53. Por otro lado, posiblemente la inhibina alfa pueda interactuar con el gen bcl-2, favoreciendo que se exprese bcl-2 y por consiguiente se suprima la apoptosis de las células del folículo en el ovario de ratas (Hsu et al, 1996).

La unión de las gonadotropinas a su receptor de la membrana de las células de la granulosa activan la vía de la proteína cinasa A (PKA) (Leung and Steel, 1992) lo cual favorece la formación de los factores de crecimiento insulinoideos IGFs por los células de la granulosa en respuesta a gonadotropinas (Giudice, 1992). Se ha demostrado que la acción antiatretogénica de FSH es parcialmente mediada a través de la producción local de IGF-I y la activación de la vía del receptor de la tirosina cinasa (Chun et al, 1994; Hsueh et al, 1996). FSH e IGF-I se han considerado como factores de supervivencia capaces de estimular la producción de estrógeno *in vivo* e *in vitro* (Adashi et al, 1985, Manikkam and Rajamahendran, 1997; Guthire et al, 1997) estudios *in vivo* han implicado al estrógeno como una hormona antiapoptótica en los folículos del ovario, mientras que los andrógenos son proapoptóticos (Billig et al, 1996; Billig et al, 1993), principalmente los estrógenos incrementan la expresión de Bcl. xL (Pike, 1999) y bloqueando la activación de la caspasa 3 (Götz et al, 1999). Al mismo tiempo que ocurre la apoptosis en folículos atrésicos se correlaciona con un descenso en los niveles del estrógeno intrafolicular (Tilly et al, 1992, Carson et al, 1981) y RNAm de aromataasa (Tilly et al, 1992).

Algunos estudios que utilizan células de la granulosa en cultivo, indican que tratamientos con FSH, LH e IGF-I son inefectivos en prevenir la apoptosis espontánea, a pesar de su acción antiapoptótica, puesto que los receptores de FSH están exclusivamente presente en las células de la granulosa, esto sugiere un importante papel de las células de la teca. IGF-I es inefectivo en prevenir la apoptosis espontánea en células de la granulosa en cultivo, pero son capaces de suprimirla en los folículos en cultivo (Giudice, 1992; Chun et al, 1994). Puesto que las células de la granulosa es la fuente principal de IGF-I en las ratas (Zhou et al, 1991) y ovejas (Tisdal et al, 1995), y que los receptores de IGF-I se expresa en las células de la granulosa y en las células de la teca en roedores (Zhou et al, 1991), en la oveja se han identificado solo el receptor IGF en las células de la granulosa (Monget et al, 1989), se puede decir que las gonadotropinas estimulan la producción de IGF-I por las células de la granulosa, y la secreción de IGF-I actúa sobre las células de la teca para estimular la producción de EGF/TGF- α y que este u otros factores pueden difundir hacia las células de la granulosa para inhibir la apoptosis.

Usando las células de los folículos de ovarios de ratas tratadas con PMSG, se ha estudiado el papel de EGF y bFGF en la apoptosis. Células de la granulosa cultivadas con EGF, TGF- α , o bFGF inhiben el inicio de la apoptosis, mientras que tratamientos con IGF-I, TGF β , o el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α) son inefectivos (Tilly et al, 1992b), al adicionar un inhibidor de la proteína cinasa (genistein) al medio de cultivo se bloquea completamente la habilidad de EGF, TGF- α , y bFGF para suprimir la apoptosis en las células de la granulosa a través de la vía de la tirosina cinasa (Yaish et al, 1988). Algunos estudios han demostrado que EGF se produce en las células de la teca de folículos de rata (Skinner et al, 1982) mientras que otros trabajos realizados con autoradiografía demuestran que existen sitios de unión a EGF en las células de la granulosa de los folículos de rata (Chabot et al, 1986). Inmunocitoquímicamente se ha localizado la proteína TGF- α en la teca y en las células intersticiales en ovarios de ratas (Kudlow et al, 1987) y bovinos (Lobb et al, 1989). Es posible pensar que la muerte de las células de la granulosa puede ser

inhibida por acciones parácrinas de EGF/TGF- α producida por las células de la teca y por acciones autócrinas o parácrinas de bFGF sintetizado en las células de la granulosa (Hsueh et al, 1994).

Miembros de la familia del IGF así como sus receptores, proteínas de unión (IGFBP) y de proteasas de IGFBP que se han encontrado dentro del ovario (Giudice, 1992; Adashi et al, 1985). La acción de las IGF puede ser antagonizado por miembros de la familia de proteínas que unen IGF (IGFBPs) (Giudice, 1992). Mientras que las gonadotropinas disminuyen la producción de IGFBPs, aumentan la producción y biodisponibilidad de IGF-I, lo cual impide la apoptosis (Adashi et al, 1990; Filder et al, 1993). Las IGFBP tienen acción opuesta a los IGFs, las proteínas de unión pueden disminuir la síntesis de DNA y la esteroidogénesis *in vitro*, (Bicsak et al, 1990; Mason et al, 1992; Chandrasekher et al, 1995). Los IGFBP participan en la atresia folicular y la apoptosis de las células de la granulosa, que ocurre en los folículos *in vivo* e *in vitro* (Chun et al, 1994; El-Roeiy et al, 1994; San et al, 1993). Los niveles en el líquido folicular de IGFBP-4 son mucho más altos en el folículo atrésico que en los folículos sanos (San et al, 1993; Schuller et al, 1993). En los folículos atrésicos las células de la granulosa expresan RNAm de IGFBP-4 (Peng et al, 1996), mientras que en los rodeos se encuentra una sobre expresión de IGFBP-4 en las células de la granulosa de los folículos atrésicos la cual se incrementa con el grado de atresia (Erickson et al, 1992a, b). En la oveja se ha encontrado que se expresa el mana de IGFBP-5 en las células de la granulosa de folículos atrésicos (Besnard et al, 1996). Las gonadotropinas *in vitro* disminuye la acumulación de IGFBP-4 del medio, y aumenta la expresión del RNAm de IGFBP-4 en un 50% en células de la granulosa (Cataldo et al, 1998), en los folículos sanos existe un aumento en la expresión del RNAm de IGFBP-4 en el folículo sano (El-Roeiy et al, 1994), mientras que las gonadotropinas estimulan la producción de proteasa de IGFBP-4 por las células de la granulosa de los folículos antrales sanos mientras que en los folículos atrésicos está ausente y favorece su acumulación en el líquido folicular (Chandrasekher et al, 1995). El Interferón gama, (INF γ) una citosina, producida por los linfocitos que invaden el cuerpo lúteo cuando se desintegra la membrana basamental folicular durante la ovulación (Wang et al, 1992; Farrar and Schreiber, 1993), puede promover la expresión del receptor de Fas por las células de la granulosa (Xiao et al, 1992; Hakuno et al, 1996), el INF γ aumenta los niveles de IGFBP-4 en el medio de cultivo sin afectar la expresión de RNAm para IGFBP-4 pero se observa un descenso en la actividad de la proteasa IGFBP-4 (Cataldo et al, 1998). La activina A producida por las células de la granulosa puede promover la acumulación de IGFBP por estas células y puede participar en promover la apoptosis (Cataldo et al, 1994; Stouffer et al, 1993; Woodruff et al, 1990).

Las gonadotropinas pueden por otro parte favorecer la sobre expresión de proteínas inhibitoras de la apoptosis (AIPs), principalmente de Hiap y Xiap, las cuales se consideran factores de supervivencia (Hakuno et al, 1996; Johnson et al, 1996; Nartin and Green, 1995) puesto que Xiap puede unirse a la caspasa-3 y -9 activada e inhibir la apoptosis (Daveraux et al, 1997, Takahashi et al; 1998; Meier et al, 2000; Sun et al; 2000), mientras que Hiap interactúa con el receptor de TNF, principalmente con TRADD formando un complejo de supervivencia (Smith et al, 1994) que facilita la proliferación celular inducida por TNF- α (Lee et al, 1997).

3.2. Inicio de la atresia por ligandos y receptores en la membrana celular.

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) induce apoptosis en algunos tipos celulares (Heller and Krönke, 1994; Hannun, 1996). Después de la activación del receptor, dos proteínas, la proteína de unión al dominio de muerte del receptor TNF (TRADD) y otra proteína de unión al dominio de muerte del receptor Fas (FADD) forman un complejo en la región intracelular del receptor de TNF- α que desencadena la muerte celular, también conocido como dominio de muerte (Hsu, et al, 1995; Chinnaiyan et al, 1996) o complejo de señalización que induce muerte (DISC) (Nagata and Golstein, 1995). La unión del complejo TRADD y FADD activan a la caspasa-8 que puede inducir apoptosis (Muzio et al, 1996; Boldin et al, 1996; Kumar and Lavin, 1996; Alnemri et al, 1996), la procaspasa-8 se une al complejo con FADD y al activarse la caspasa-8 es liberada del complejo (Nagata and Golstein, 1995). Se ha observado que TNF- α induce la producción de ceramida en los lisosomas y que como ya se mencionó está involucrada en la citotoxicidad (Heller and Krönke, 1994; Kull and Cuatrecasas; 1981; Watanabe et al, 1988; Watanabe et al, 1989; Watanabe et al, 1988). TNF- α puede inducir apoptosis en las células de la granulosa de aves y tiene un papel importante en la atresia folicular (Witty et al, 1996), antes de inducir la muerte en las células ováricas, la acción primaria del TNF- α en el ovario es, inhibir la producción de progesterona (Roby and Terranova, 1990), estrógenos (Adashi et al, 1989) y andrógenos (Andreani et al, 1991). TNF- α puede ser producido por las células de la granulosa y de la teca (Chen et al, 1993). Se ha demostrado que TNF- α una vez unido a su receptor puede desencadenar la degradación intracelular de esfingomielina a ceramida, lo cual puede ser un evento temprano de la acción de TNF- α (Pushkareva et al, 1995). Dentro del ovario, la ceramida puede inhibir a P450_{scc} (Santana et al, 1996), a la 3-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa (Santana et al, 1996), la actividad de P450 aromatasa (Santana et al, 1995) en las células de la granulosa de rata y puede inducir apoptosis en las células de la granulosa de aves (Santana et al, 1996).

El receptor Fas pertenece a la familia de las glicoproteínas integrales de la membrana celular que incluyen al receptor del factor de crecimiento nervioso y al receptor del factor de necrosis tumoral (Itoh et al, 1991). Su ligando (Fas ligando (FasL) es una proteína homóloga al factor de necrosis tumoral que es conocido por ser un factor proapoptótico (Suda et al, 1993). La unión de FasL con su receptor Fas o con anticuerpos agonistas conduce a la apoptosis de las células portadoras del receptor Fas (Suda et al, 1994; Yonehara et al, 1989). El receptor Fas y su mensajero se han detectado en células de la granulosa (Hakuno et al, 1996; Quirk et al, 1995; Kondo et al, 1996). Hakuno et al (1996) el receptor Fas y FasL se han implicado en el control de la apoptosis de las células de la granulosa durante la atresia folicular de folículos antrales en varias especies de mamíferos (Tilly et al, 1995b; Hakuno et al, 1996; Quirk et al, 1995, Kim et al, 1998; Kim, et al, 1999). Fas/FasL también se han involucrado en la regulación de la apoptosis de las células de la granulosa en folículos preovulatorios en ovarios de ratas (Kim, et al, 1999). En células de la granulosa de folículos atrésicos antrales de ratas, el receptor de Fas y FasL forman agregados, posiblemente esto quiere decir que se requiere de una oligomerización del sistema Fas/FasL para la inducción de la apoptosis (Rehemtulla et al, 1997). La supresión de gonadotropinas resulta en la sobreexpresión Fas/FasL y la inducción de la atresia folicular. (Li et al, 1998)., se ha demostrado que en folículos sanos no hay células del sistema inmune, así como en otros órganos como en el testículo y en los ojos, como

consecuencia del alto contenido de FasL en las células de la teca de los folículos sanos que funcionan como una barrera que induce apoptosis en células inmunes que contienen el receptor a Fas (Bellgrau et al, 1995; Griffith et al, 1995; Parrott, 1960; Streilein, 1995).

3.3. Genes que participan en la atresia folicular.

3.3.1. Familia de Bcl-2.

Se ha propuesto que el destino de la célula durante el desarrollo se decide por el balance entre represores e inductores de muerte dentro de una célula a un tiempo determinado (Barinaga, 1994) En el ovario, la atresia folicular representa un buen ejemplo de este balance entre represores e inductores de la muerte (Tilly, 1993) que podría involucrar a los miembros de la familia de bcl-2 para desencadenar o inhibir la apoptosis de las células de la granulosa en la atresia. (Tilly et al, 1995).

El gene de bcl-2 se identificó en las células malignas del sistema inmune en humanos (Cclar et al, 1986). La sobre expresión de bcl-2 promueve la supervivencia en varios tipos celulares *in vivo* e *in vitro* (Nunez et al, 1994; Nunez,1990) que incluyen células del sistema inmunes (Henderson et al, 1991; Sentman et al, 1991), células hematopoyéticas (Vaux et al, 1988) y neuronas (Garcia et al, 1992). En la familia de Bcl-2, existen miembros proapoptóticos y antiapoptóticos (Vaux et al, 1988, Bissonette et al, 1992, Fanidi et al, 1992; Boise et al, 1993). Más ampliamente, los miembros de esta familia se pueden dividir en tres grupos: 1).- Miembros antiapoptóticos entre los que se encuentran ced-9, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 y Bfl-1 (Boise et al, 1993, Gibson et al, 1996, Choi et al, 1995, Choi et al, 1997, D'Sa-Eipper, 1998, Lin et al, 1996, Reynolds et al, 1994). 2).- Miembros proapoptóticos, las proteínas de este grupo incluyen a Bax, Bak, Bok y Bcl-2 x_{short} que no solo antagonizan los efectos de las proteínas antiapoptóticas de Bcl-2 sino que además son capaces de activar la apoptosis en las células (Boise et al, 1993; Chittenden et al, 1995a, Chinttenden et al, 1995b, Farrow et al, 1995, Hsu et al, 1997a, Kiefer et al, 1995, Oltvai et al, 1993). 3).- Miembros proapoptóticas con función de ligando, que se encuentran en forma soluble en el citosol Bad, Bod/Bim y Bid (Hsu et al, 1998, Wang et al, 1996, Yang et al, 1995) mientras que otras se encuentran en la membrana mitocondrial, como Bik/Nbk, Blk, Harakiri/DP5, NIP3L/Nix y NIP3 (Chen et al, 1999, Chen et al, 1997, Han et al, 1996, Hegde et al 1998, Imaizumi et al, 1997, Inohara et al; 1997, Matsushima et al, 1998).

Cuadro 1. Miembros de la familia de Bcl-2.

ANTIAPOPTOTICOS.	PROAPOPTOTICOS.	
	Unidos a la membrana mitocondrial.	Los que no estan unidos a la membrana mitocondrial con función de ligando.
Ced-9.	Bax.	Bad.
Bcl-2.	Bak.	Bod/Bim.
Bcl-xL.	Bok.	Bid.
Bcl-w.	Bcl-x short.	
Mcl-1.		
Bfl-1.		

En condiciones *in vivo* se ha observado que las gonadotropinas, , reducen los niveles del RNAm de Bax. En folículos mantenidos en cultivo sin gonadotropinas se incrementan el mensajero de Bax y no se afectan los niveles de los mensajeros de bcl-2 y de bcl-1-x^{long} esto permite concluir que los niveles bajos de Bax es la señal que determina la sobrevivencia folicular (Tilly et al 1995a), y los niveles altos se relacionan con la atresia (Tilly et al, 1995; Knudson et al, 1995; Kugu et al, 1998). Algunos investigadores han identificado que los niveles de RNAm de bcl-2 y bcl-xL son mayores en las células de la granulosa de los folículos de aves destinados a ovular con una menor probabilidad de sufrir atresia comparados con los células de la granulosa de los folículos menos maduros que tienen una alta posibilidad de ser atrésicos (Johnson et al, 1993; Johnson and Tilly, 1994). La expresión del RNAm de bcl-2 se ha reportado en ovarios de gallinas (Nunes and Clarke, 1994) y de ratas (Tilly et al, 1995); sin embargo el papel potencial en la vía de supervivencia celular de Bcl-2 en el ovario no es claro (Hsu, et al, 1996). El efecto de Bcl-2 sobre la supervivencia de los folículos del ovario *in vivo* se ha estudiado generando ratones transgénicos que sobre expresan bcl-2 lo que conduce a una disminución de la atresia folicular (Hsu et al, 1995). Por lo que Bcl-2 puede ser un factor de supervivencia *in vivo* importante en el ovario del ratón (Hsu et al, 1996; Ratts et al, 1995).

Una proteínas que interactúa con Bcl-2, Bad (Yang et al, 1995), se encuentra como un ligando proapoptótico que se une a miembros la familia de Bcl-2 antiapoptóticas en el ovario, Bad puede ser regulado por proteínas como 14-3-3 y P11 (Hsu et al, 1997a; Hsu et al, 1997b; Hsu et al, 1995). 14-3-3 es una proteína altamente conservada que se encuentra en todos los organismos eucariontes, la cual puede regular la actividad proapoptótica de Bad (Hsu and Hsueh, 2000) mientras que P11 una proteína inducida por factores de supervivencia como hormonas extragonadales, puede interactuar con Bad (Hsu et al, 1997b, Zha et al, 1996). Cabe señalar que las proteínas 14-3-3 y P11 solo se pueden unir con Bad fosforilado (Leo et al, 1999). La fosforilación de Bad juega un papel esencial sobre la inhibición de la actividad proapoptótica, IGF-I al unirse a su receptor puede fosforilar a Bad (Datta et al, 1997, Kulik and Weber, 1998) lo que facilitan su unión con la proteína 14-3-3 o con P11, las gonadotropinas pueden favorecer la expresión de P11 lo que conduce a una disminución de la muerte celular (Hsu et al, 1997b, Zha et al, 1996).

Bod un ligando proapoptótico de la familia de Bcl-2 se ha aislado del ovario (Hsu et al, 1997b, Hsu et al, 1995). Bod, también conocido como Bim (O'connor et al, 1998) interactúa con diversas proteínas de Bcl-2 antiapoptóticas que incluyen Mcl-1, Bcl-2, Bcl.xL, Bcl-w, Bfl-1 para desencadenar la muerte celular (Hsu et al, 1995). Similarmente a Bod, Bad puede heterodimerizarse con proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 (Kelkar et al, 1997).

Todo parece indicar que el miembro de la familia bcl-2 antiapoptótico, Mcl-2 es un homólogo en el ovario mamíferos de ced-9 del nemátodo *C. elegans*, que en su momento dimeriza con miembros proapoptóticos de Bcl-2, Bok, Bax, Bod, Bad, apoptosis (Hsu et al, 1997b, Hsu et al, 1998; Leo et al, 1999). La proteína antiapoptótica Mcl-1 previene la apoptosis al impedir la liberación del factor activador de proteasas apoptóticas (Apaf-1) el cual activa a las caspasas en la fase de ejecución de la apoptosis, Apaf-1 se expresa en células de la granulosa de humanos y en ratones (Izawa et al, 1998, Robles et al, 1999) se menciona que las gonadotropinas suprimen la expresión de Apaf-1 y que una proteína de la familia de Bcl-2 específica del ovario, Diva/Boo, es capaz de unirse a Apaf-1 (Inohara et al, 1998, Song et al, 1999).

El Bcl-2 se ha identificado en el ovario, testículos, y útero, como un miembro de la familia de bcl-2 proapoptótico (Hsu et al, 1997a), que se une preferentemente con miembros antiapoptóticos como Mcl-1, Bfl-1, pero no interactúa con Bcl-2, Bcl-w, y Bcl-xL (Hsu and Hsueh, 2000). Su habilidad para desencadenar la muerte requiere de su coexpresión con Mcl-1 (Hsu et al, 1997a).

3.3.2. P53.

El gen p53, es un gen supresor de tumor que tiene un importante papel en el mecanismo que media la apoptosis en tejido extragonadal (Gottlieb and Oren, 1998, Kaelin, 1999, Yonish-Rouyeh et al, 1991, Makrignakis et al, 2000). El gen p53 interviene para reparar el genoma celular dañado por especies oxido reactivas y radiación ionizante (Kastan et al, 1991, Fritschen et al, 1993). El daño al DNA desencadena un incremento rápido en los niveles de la proteína p53, seguido por un arresto del ciclo celular en la fase G₁/S, p53 al activar el gen WAF-1/CIP-1 un gen antiproliferativo (Crook et al, 1994; Waga, et al, 1994; Levine, 1997; Agarwal et al, 1998); la acción de p53 permite reparar el daño antes de que ocurra la síntesis de DNA o si el daño es muy extenso puede desencadenar la apoptosis p53 y eliminar a la célula para mantener la homeostasis genética (Fritsche et al, 1993; Lowe et al, 1993; Gottlieb et al, 1994; Ko and Prives, 1996; Levine, 1997; Long et al, 1997; Gottlieb and Oren, 1998;).

p53 puede regular varias proteínas relacionadas con la apoptosis, como Bax, (Okamoto and Beach, 1994), IGFBPs (Buckbinder et al, 1995), y Fas. p53 puede actuar directamente al incrementar la actividad transcripcional del gen Bax o indirectamente al inactivar bcl-2, promoviendo la apoptosis (Otvai et al, 1993; Yiu et al, 1994; Hainaut 1995). En células de la granulosa de los folículos atrésicos de rata existe una correlación positiva entre la apoptosis y la sobre expresión de bax cuando se disminuye la aportación de gonadotropinas (Tilly et al, 1995a) mientras que p53 es altamente expresado en células de la granulosa apoptóticas (Tilly et al, 1995b). Se ha reportado que (Muller et al, 1997) en folículos moderadamente atrésicos p53 se localiza en el núcleo de las células de la granulosa y simultáneamente se han detectado Fas y FasL, mientras que en folículos severamente atrésicos se observa una disminución de p53 en el núcleo y un aumento del receptor Fas y FasL, estas observaciones aumentan la posibilidad de que se requiera de la acumulación nuclear de p53 para aumentar Fas y FasL en células de la granulosa *in vivo* y que p53 es degradado en las células que experimentan estados finales de la apoptosis después de la activación de FasL (Kin et al, 1999). La sobre expresión de p53 en células de la granulosa resulta en un incremento del Fas y de apoptosis (Kin et al, 1999). Es necesario que p53 se fosforile para ejercer su efecto apoptótico en los folículos antrales grandes (Kin et al, 1999), otros estudios le han dado una gran importancia a la fosforilación de p53 traslación y traslocación al núcleo en varios tipos celulares (Siliciano et al, 1997; Kapoor and Lozano, 1998). Colectivamente se soporta la hipótesis que la traslocación nuclear de p53 en células de la granulosa es precursor del daño durante la atresia folicular (Keren-Tal et al, 1995; Tilly et al, 1995b, Kim et al, 1999).

3.3.3. WT1

El gen tumor de Wilms WT1 es un inhibidor del gen p53 el cual puede evitar el inicio de la apoptosis inducida por p53 (Davies et al, 1999). WT1 se ha localizado en las

células de la granulosa de los folículos primordiales y sus papel más importante es mantener en estado latente a los folículos (Makrigiannakis et al, 2000). En el ovario la expresión del gen WT-1 se ha demostrado que puede ser regulado por gonadotropinas (Tilly et al, 1995b). Se ha sugerido que existe una interacción entre p53 y WT-1 para regular bcl-2 en células extragonadales (Maheswaran et al, 1993), el cual puede tener un papel importante en el control de la muerte celular de la granulosa durante la atresia folicular (Amsterdam and Selvaraj, 1997). WT-1 puede reprimir la actividad promotora del gen de inhibina, la proteína de WT-1 interactúa directamente con el promotor del gene de inhibina-alfa (Chun et al, 1999).

4. Remodelación tisular en el inicio de la atresia folicular.

Otro mecanismo que puede participar como desencadenante de la atresia folicular es la inadecuada remodelación del tejido ovárico y folicular. En ovarios de cabra se ha observado que existe un incremento paulatino de la actividad enzimática lisosomal libre y unida relacionado con el desarrollo normal de los folículos en las cabras (Ballesteros et al, 1992), esto puede ser una consecuencia de la acción de los gonadotropinas que puede labilizar a los lisosomas y aumentar la liberación de enzimas de los lisosomas existentes, o bien aumentar el número de lisosomas y su labilización (Rahi and Srivastava, 1984 ;Elfant et al, 1977). Otros estudios en los cuales se induce superovulación con PMSG se observa un incremento de la actividad enzimática libre y unida de las células de la teca y que es posible que estos cambios en la actividad lisosomal sean característicos del crecimiento y maduración foliculares (Rahi and Srivastava, 1984; Baños et al, 1996).

5. Participación de enzimas lisosomales en el inicio de la atresia.

Alteraciones bioquímicas de las células de la granulosa frecuentemente preceden cambios morfológicos definidos en las células de la granulosa (Mori, et al, 1982), estos cambios incluyen incremento de enzimas lisosomales como la fosfatasa ácida y aminopeptidasa (Lobel et al, 1961) que puede participar en la atresia folicular (Ryan, 1981). El ovario de ratas de 21 a 22 días de edad consisten de folículos primarios y preantrales, una simple inyección de la dehidrotestosterona (**DHT**) resulta de 12-18 días más tarde en un drástica reducción del suero de FSH y LH, y esto es asociado 48 h postinyección con un incremento de la actividad de catepsina-D (una enzima lisosomal) en células de la granulosa (Dhanasekaran and Moudgal, 1986). El incremento de la actividad de la catepsin-D iniciado por el descenso de FSH y LH es reversible al administrarse FSH. Los lisosomas pueden participar en el proceso de atresia folicular la membrana de la mitocondria, la membrana celular, el laminin, y otros complejos intracelulares pueden ser sometidos a la degradación, seguido por la fragmentación del DNA debido a endonucleasas específicas (Liu et al, 1996; Darzynkiewicz et al, 1997). Tilly y colaboradores (1992), han encontrado un descenso en la concentración de estrógenos en los folículos de porcinos que se puede correlacionar con la presencia de fragmentación internucleosomal del DNA que es una evidencia de atresia folicular. Se ha observado un incremento en la expresión de catepsina D (Dhanasekaran and Moudgal, 1989).

IV. Muerte celular en la atresia folicular.

Existen diversas teorías que tratan de explicar las causas que originan la atresia folicular, las cuales han sido revisadas por Rosado y Rosales (1991); estas involucran desde sustancias intraováricas capaces de inducir la atresia; la activación del complemento, al destruirse las células de la granulosa; el desarrollo aberrante de receptores de la teca y granulosa; inhibición en la síntesis de novo de estrógenos por las células de la granulosa, por la falta de la síntesis de novo de andrógenos de la teca o por la falta de síntesis de estrógenos en la granulosa por falta de receptores que estimulen su síntesis; por la falta de enzimas que participan en la remodelación tisular y finalmente la reducción del aporte sanguíneo (que es consecuencia más que causa). Pero todas ellas deben incluir finalmente un proceso que involucra la producción de la muerte celular.

La atresia folicular es un evento predominante en el ovario que puede ser la consecuencia del inicio y progresión de la muerte de las células de la granulosa en todas las especies de vertebrados estudiadas en las que se incluye al humano (Byskov, 1978; Hughes and Gorospe, 1991; Tilly et al, 1991; Tilly, 1993; Billig et al, 1994; Breckwoldt et al, 1996; Chun et al, 1994; Jolly et al, 1997; Yuan and Giudice, 1997; Makrigiannakis et al, 1999). La muerte de las células de la granulosa conducen a la destrucción de la capa que tapiza la pared interior del folículo (Rajakoski, 1996) y desencadenan la atresia del folículo (Hughes and Gorospe, 1991) e incluso los cambios morfológicos asociados con la atresia son eventos tardíos que ocurren durante la muerte celular (Tilly et al, 1991). La atresia es la consecuencia de componentes celulares individuales de la muerte dentro del folículo, por lo que es necesario examinar la naturaleza de la muerte de las células de la granulosa (Hughes and Gorospe, 1991).

1. Tipos de muerte celular en la atresia folicular.

La muerte celular es el proceso que culmina con la suspensión de la actividad biológica. En contraste con la quiescencia celular o latencia, que también se caracteriza por disminuir su actividad biológica, los cambios que acompañan a la muerte son irreversibles (Darzynkiewicz et al, 1997).

El proceso de muerte se ha dividido en tres fases diferentes una fase de inducción o premitocondrial, una fase efectora o mitocondrial y una fase de degradación o postmitocondrial (Kroemer, 1995; Thompson, 1995; Loeffler and Kroemer, 2000).

La fase de inducción o premitocondrial. Constituye una vía privada o particular en la cual se traduce la señal de muerte o las vías de daño son activadas dependiendo de cada célula (Thompson, 1995; Loeffler and Kroemer, 2000).

La fase efectora o mitocondrial. Se ha postulado la existencia de un “ejecutor central” (Kroemer et al, 1995) también llamado “máquina de muerte” (Martin and Green, 1995). Durante esta fase, se permeabiliza la membrana mitocondrial (Loeffler and Kroemer, 2000). En la necrosis y en la apoptosis se observa la disminución del potencial de membrana mitocondrial (Zanzami et al, 1997). La cantidad de mitocondrias con una disminución del potencial de membrana mitocondrial determinará el tipo de muerte, el cual puede ir desde la autofagia, apoptosis y necrosis (Lemaster et al, 1998). La permeabilidad mitocondrial se considera el punto de no retorno del proceso de muerte celular (Penninger and Kroemer, 1998).

La fase de degradación o postmitocondrial. En esta fase de degradación se observan las manifestaciones a nivel morfológico característicos de cada tipo de muerte celular (Penninger and Kroemer, 1998).

1.1. Necrosis.

El término necrosis del griego *nékrosis* “mortificación” se ha utilizado para describir cambios dramáticos de la célula que se observan después de ocurrir la muerte, estos cambios incluyen cariólisis, picnosis y cariorexix y condensación en el núcleo y pérdida de la estructura y fragmentación de la célula (Majno y Joris, 1995).

La necrosis involucra un dramático incremento en el volumen celular y la hinchazón de organelos como las mitocondrias con pocos cambios en el núcleo por lo que se ha propuesto el término de “oncosis” hinchazón para designar este tipo de muerte celular (Majno y Joris, 1995). Estos cambios terminan con la disolución de organelos y la ruptura de la membrana plasmática (Ogihara et al, 2000), seguido de la salida del contenido celular hacia el espacio extracelular acompañado de una reacción inflamatoria (Trump et al, 1982). Estos cambios son debidos a la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática (Trump et al, 1975), principalmente la disminución de la actividad de la bomba de iones (Schanne et al, 1979) a consecuencia de la disminución intensa del ATP (Jennings and Reimer, 1981; Ankarcona et al, 1995). La necrosis es acompañada de la pérdida de la asimetría de la membrana citoplásmica que se observa como la exposición de fosfatidil serina en la cara externa de la membrana (Vermes et al, 1995). En las células normales los fosfolípidos se distribuyen asimetricamente en la membrana plasmática la fosfatidil serina y la fosfatidiletanolamina se encuentran en la cara interna de la membrana plasmática. El mecanismo por el cual se expone la fosfatidil serina involucra la inhibición de la flipasa traslocasa aminofosfolípido dependiente de ATP (Tang et al, 1996) o la activación de una enzima activada por calcio que puede alterar a la membrana plasmática, (Verthoven et al, 1995) los queladores de Ca^{2+} inhiben parcialmente la pérdida de la asimetría de la membrana citoplásmica (Hampton et al, 1996). El PARP poli-(ADP-ribosa) polimerasa, una enzima que repara el DNA dañado y la cual consume ATP en su proceso, no muestra alteraciones en la necrosis y contribuye al descenso de ATP que se observa en la necrosis (Ogihara et al, 2000).

El incremento del calcio citosólico libre resulta en la activación de fosfolipasas unidas a la membrana, que degradan los fosfolípidos de la membrana y causan perturbación de la membrana en el proceso de la necrosis (Chien et al, 1978; Smith et al, 1980). La liberación de hidrolasas por la ruptura de los lisosomas causa un rápida disintegración de la célula en los estados tardíos de la necrosis (Hawkins et al, 1972). Se degradan proteínas, RNA y DNA (Trump et al, 1982). El DNA es expuesto por la digestión de las histonas y es dividido por desoxiribonucleasas lisosomales en fragmentos con tamaño discontinuo (Afanas'ev et al, 1986; Duvall and Wyllie, 1986.).

Se menciona que la necrosis participa en etapas tardías de la atresia folicular en la oveja (Jolly et al, 1997), sin embargo, la participación de la necrosis en las fases tempranas del proceso apoptótico puede ser soportado por el conocimiento de que los leucocitos (Bukovsky et al, 1979; Hirshfield, 1991), linfocitos citotoxicos T (Greenwald and Roy, 1994), y macrófagos (Gaytan et al, 1998) invaden a la granulosa como parte del desarrollo de este proceso, indicando la participación activa de ciertas células inflamatorias como respuesta a la liberación de fragmentos celulares en la necrosis. Kovacs et al (1992) sugiere

que la necrosis es la forma de muerte celular dominante en los folículos atrésicos de la Oca mientras que Rosales et al (2000) encontraron que en ovejas, la necrosis es una importante forma de muerte durante la atresia de folículos de diámetro mayor de 6 mm.

1.2. Apoptosis.

El término apoptosis se propuso por Kerr et al; (1972); para describir un tipo de muerte celular caracterizados por la contracción celular y a la marginación de la cromatina contra la membrana nuclear lo cual crea curvas que se han descrito como pétalos, por lo cual se le nombró apoptosis que es un término de origen griego para referirse a los pétalos de flores cuando caen (Schwartzman and Cidlowski, 1993; Majno and Joris, 1995). Sin embargo actualmente se ha utilizado indiscriminadamente el término de apoptosis como sinónimo de muerte celular programada (PCD), el programa genético que decide cuando iniciar la PCD desencadena otro programa que decide como realizar la muerte (Majno and Joris, 1995) el cual puede ser por uno de tres mecanismos de muerte como la autofagia, la apoptosis y la necrosis (Schweichel and Merker, 1973, Fiers et al, 1999; Beaulaton and Lockshi, 1977; Clarke, 1990; Schweichel and Merker, 1973; Shibahara et al, 1995; Zakeri et al, 1995; D'Herde et al, 1996; Jochova et al, 1997). El programa genético que decide cuando iniciar el suicidio puede ser activado a un tiempo determinado; puede requerir de un factor endógeno o exógeno, o de estímulos patológicos (Columbano, 1995; Farber, 1994).

Las características morfológicas de la apoptosis se han descrito en numerosos tipos celulares bajo un gran rango de condiciones experimentales y fisiológicas (Kerr et al, 1972; Majno and Joris, 1995) incluyen la liberación de la célula de la matriz extracelular la cual adopta una forma más redonda (Lee et al, 1997), condensación del citoplasma, condensación de la cromatina nuclear y fragmentación internucleosomal (Wyllie et al, 1980; Wylli, 1981; Walker et al, 1988). La activación de una endonucleasa, dependiente de calcio y magnesio, la cual rompe el DNA de manera específica en el espacio internucleosomal produciendo fragmentos de 180-200 pares de bases y sus múltiplos (Wyllie, 1980; Earnshaw, 1995; Hsueh et al, 1996). En la apoptosis ocurren cambios en la superficie de la membrana como la expresión de sitios de unión a trombospondina (Pytela et al, 1985), pérdida de los residuos de ácido siálico (Savill et al, 1993), la exposición de fosfatidilserina (Fadok et al, 1992; Schlegel et al, 1993; Emoto et al, 1997) y la formación de ampollas en la membrana citoplásmica (Martin et al, 1995; Wang et al, 1998; Jewell et al, 1982). Estos cambios tempranos son los responsables de que las células apoptóticas sean rápidamente reconocidas por las células que las fagocitaran, evitando así la ocurrencia de procesos inflamatorios en este tipo de muerte (Vaux et al, 1992). Los niveles de ATP no descienden en la apoptosis (Ankarcrona et al, 1995), se requiere de ATP en la progresión de la apoptosis (Leist, et al, 1997; Eguchi et al, 1997). El PARP es degradado y se ha utilizado como un distintivo de la muerte celular que ocurre por apoptosis (Ogihara et al, 2000). La fase de degradación de la apoptosis en general se ha subdividido en tres etapas en la primera la célula se libera de la matriz extracelular; la segunda etapa corresponde a la formación de ampollas y finalmente el estado de condensación (Mills et al, 1999).

Uno de los principales mediadores de la apoptosis son las caspasas (Cohen, 1997, Crynes and Yuan, 1998), las caspasas dividen proteínas del citoesqueleto de la célula de forma específica y de sustratos de muerte por lo que dirigen los cambios morfológicos característicos del fenotipo de la apoptosis (Porter et al, 1997; Tan and Wang, 1998).

Las CASPasas (proteasas específicas de aspartato citosólico) pertenecen a la familia de las cisteína proteasas que dividen proteínas en los residuos aspártico (Alnemri et al, 1996; Nicholson et al, 1995, Thornberry et al, 1997). En general, tres aminoácidos que se encuentran después del residuo aspártico en el sustrato le dan la especificidad de reconocimiento a cada caspasa (Thornberry et al, 1997). Como otras proteasas celulares, las caspasas son sintetizadas como proenzimas inactivas, están formadas por dos subunidades unidas por su dominio inhibitorio amino terminal, pueden ser divididas en sus residuos aspártico resultando en la eliminación del dominio inhibitorio y la formación de dos subunidades pequeñas y dos subunidades grandes, la unión de las subunidades forma una enzima heterotetramérica activa (Steller, 1998). Las caspasas pueden ser divididas en dos clases: las caspasas iniciadoras, que tienen un gran dominio, como la caspasa 8, 9, que directa o indirectamente son activadas y las caspasas efectoras, como las caspasas-3, -6, y -7 (Srinivasula et al, 1996; Thornberry and Lazabnik, 1998), el dominio grande de las caspasas es un sitio de unión a FADD o con Apaf-1 que inicia la activación de las caspasas con grandes dominios como la caspasa 8 y 9 (Muzio et al, 1996, Butt et al, 1998; Martin et al, 1998; Yang et al, 1998; Kumar and Colussi, 1999). Las caspasas-3,-8 y -9 son críticas para la apoptosis puesto que las caspasa -8 y-9 activan a la caspasa-3, esto se demuestra en ratones mutantes para las caspasa-3,-8 y -9 que no desarrollan apoptosis (Kuida et al, 1995). Además la caspasa -8 puede activar a todas las caspasas conocidas in vitro (Srinivasula et al, 1996). El dominio de muerte de Fas FADD recluta a la procaspasa-8, al activarse la caspasa-8 (Boldi et al, 1996; Muzio et al, 1996) es liberada del DISC y puede actuar por dos vías (Nagata and Golstein, 1995; Kischkel et al, 1995; Muzio et al, 1996), en una la caspasa 8 directamente activa a la caspasa-3 (Scaffidi et al, 1998) y en la otra la caspasa-8 divide a Bid, un miembro proapoptótico de la familia de Bcl-2 (Woo et al, 1999) Bid activado puede favorecer la liberación del citocromo c de la mitocondria (Wang et al, 1996; Li et al, 1998; Luo et al, 1998) que interactúa con Apaf-1(Factor activador de apoptois-1), que se encuentra en el citoplasma junto a ATP o ATP, para activar a la caspasa-9 e iniciar la cascada de degradación por la caspasa-3 en el proceso de muerte (Li et al, 1997b).

De acuerdo con su sustrato específico las caspasas pueden dividirse como 1). YVADasa (caspasas -1, -4 y -5) que está involucrado en la producción de citocinas. 2). DEVDasa (caspasa -3 y -7) que son los principales efectores durante la apoptosis. 3). IETDasa. Que involucra a las caspasas (-6, -8, -9 y -10) que activan a las DEVDasa e inician la muerte celular (Samali et al, 1999).

La división de actina, citoqueratina, laminina y otras proteínas del citoesqueleto están involucradas en la fase de ejecución de la apoptosis y en la manifestación de los cambios morfológicos característicos de la apoptois (Cotter et al; 1992; Bonfoco et al, 1996; Brancolini et al, 1997; Brown et al, 1997; Caulin et al, 1997; Chen et al, 1996; ; Kayalar et al, 1996; Kothakota et al, 1997, Kruidering et al, 1998; Ku et al, 1997; Levee et al, 1996; Porter and Janicke, 1999; Schmeiser and Grand, 1999; Takashashi et al, 1996; Tinnemans et al, 1995; van Engeland et al, 1997; MacFarlane et al, 2000). En la fase de ejecución de la apoptosis se observa que la célula se libera de la matriz extracelular y adopta una forma más redonda, las caspasas reorganizan y dividen la actina del citoesqueleto (Lee et al, 1997; Kothakota et al, 1997); la caspasa- 3 divide al fodrin (Janicke et al, 1988b; Waterhouse et al, 1998) lo cual se requiere para la formación de ampollas (Martin et al, 1995b; Wang et al, 1998; Janicke et al, 1998b; Zheng et al, 1998; Nicotera and Leis, 1997; Tsujimoto, 1997). Mientras que la participación de las caspasas en

la fase de condensación es incierta se ha observado que las células no muestran condensación al inhibir a las caspasas y pueden quedar atrapadas en el estado de ampolla (Hirata et al, 1998). Gas 2 es otro componente del sistema de microfilamentos (Lee et al, 1999) que favorece la condensación de la célula pero es activado de forma indirecta por las caspasas al reorganizar los filamentos de actina (Sgorbissa et al, 1999).

Las caspasas dividen sustratos de muerte como es el caso del PARP, laminina nuclear y Bcl-2 (Lazebnik et al, 1994; Takashashi et al, 1996; Brancolini et al, 1997). El PARP es degradado en dos subunidades, una de 25 kDa y otra de 89 kDa (Kaufmann et al, 1993) principalmente por la actividad de la caspasa 3 (Boulares et al; 1999).

Por otro lado las caspasas están también involucradas en la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática ya que se ha observado que la exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana es prevenida por la inhibición de las caspasas (Martin et al, 1996; Naito et al, 1997) las caspasas al degradar al fodrin, una proteína del citoesqueleto, altera los sitios de unión de la fosfatidilserina en el interior de la membrana plasmática lo que favorece la exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana (Vanege et al, 1996).

Las caspasas son responsables indirectamente de la degradación del DNA y de los cambios morfológicos observados en el núcleo puesto que generan factores que desencadenan la fragmentación del DNA, como la DNasa activada por caspasas (CAD) o también conocido como factor fragmentador de DNA (DFF) (Enari et al, 1998). en las células CAD se encuentra unido a una subunidad inhibitoria de la DNasa activada por caspasas, ICAD, forman un complejo CAD/ICAD que permanece en el citoplasma, la caspasas-3 y 7 activada puede dividir ICAD (McLroy et al, 1999, Wolf et al, 1999; Enari et al, 1998; Sakahira et al, 1998) y libera a CAD que degrada el DNA (Liu et al; 1997; Enari et al; 1998; Nagata, 2000) pero no divide al RNA (Liu et al, 1998). CAD también es responsable de la condensación del DNA (Liu et al, 1998; Sakahira et al, 1999), mientras que el papel en la condensación del DNA del factor inductor de apoptosis (AIF), que es liberado por la mitocondria y que participa en la fragmentación del DNA, no se ha determinado (Susin et al, 1999).

Estudios bioquímicos y morfológicos han demostrado que la muerte de las células de la granulosa y de células germinales ocurre principalmente por apoptosis en ovarios de ovinos, porcinos, aves, bovinos, y roedores (Hay et al, 1976; O'Shea et al, 1978; Tsafiriri and Braw, 1984; Arends et al, 1990; Hughes and Gorospe, 1991; Tilly et al, 1991; Billig, et al, 1993; Pesce et al, 1993; Hsueh et al, 1994; Jolly et al, 1994; Hsueh et al, 1996; Jolly et al, 1996; Jolly et al, 1997; Manabe et al, 1997; Myoumoto et al, 1997; Manabe et al, 1998), así como en la regresión del cuerpo lúteo, células de la granulosa/luteinizadas (Tilly et al, 1991; Rueda et al, 1995), células de la teca (Hay et al, 1976, O'Shea et al, 1978, Tsafiriri and Braw, 1984) y en la remodelación de estructuras postovulatorias en diversas especies (Tilly et al, 1991), así como en la superficie del epitelio del ovario y las células apicales del folículo durante el proceso de ovulación (Ackerman and Murdoch, 1995, Murdoch, 1995). Estos datos parecen demostrar que la apoptosis se trata de un mecanismo común dentro de las células del ovario en ovejas, así como en otras especies.

1.3. Autofagia o muerte celular citoplásmica.

La autofagocitosis se puede considerar como un proceso que puede degradar proteínas y organelos, no esenciales, dentro de los lisosomas para su subsecuente digestión

por sus potentes hidrolasas, la cual puede ser iniciada por falta de alimentos (Takeshige et al, 1992; Kadowaki et al, 1996; Blomart et al, 1997; Kim and Klionsky, 2000) puede participar en la protección al daño inducido por radiación (Paglin et al, 2001), El mecanismo requiere de la formación de un autofagosoma, que es una vacuola de doble membrana (Takeshige et al, 1992). La muerte celular que muestra fragmentación nuclear y picnosis, que es precedida por la eliminación autofágica de ribosomas, aparato de golgi y retículo endoplásmico y la presencia de residuos amorfos en el citoplasma de la células se conoce como muerte celular autofágica (Bursch et al, 1996). Una de las características de la muerte autofágica es que depende de un citoesqueleto integro principalmente de filamentos intermediarios, como citoqueratina y vementina (Aplin et al, 1992; Blankson, et al, 1995; Bursch et al 2000), puesto que los microfilamentos son esenciales para la formación de autofagosomas, mientras que la fusión de los autofagosomas a los lisosomas depende de los microtubulos (Blomart et al, 1997), se requiere de ATP para la formación del autofagosoma y para la degradación de material citoplásmico en las vacuolas autofagocíticas (Luiken et al, 1996; Plomp et al, 1988; Schellens and Meijer, 1991). La autofagia no requiere de la activación de las caspasas conocidas aunque se ha reportado que puede estar activada la caspasa 7 (Berndt et al, 1998; Poter and Jänicke, 1999; Kitanaka and Kuchino, 1999).

D'Herde y colaboradores (1996); han distinguido tres tipos de muerte celular en las células de la granulosa de folículos atrésicos de codorniz, la apoptosis, la necrosis y la autofagia.

1.4. Diferenciación terminal que conduce a la muerte.

La diferenciación terminal que conduce a la muerte es un mecanismo alternativo que ocurre en ciertos tipos celulares, como en los glóbulos rojos (Castoldi y Beutler, 1988) y en la capa exterior de la piel (Stenn, 1983) involucra la expulsión del núcleo antes de que se suspenda función celular que conduce en última medida a la muerte celular, las células muestran un núcleo característico de la apoptosis, sin mostrar la fragmentación típica de la apoptosis (van Wezel et al, 1999). Ultraestructuralmente no se observan cambios relacionados con la necrosis como las alteraciones en la permeabilidad de la membrana y la lisis de organelos (van Wezel et al, 1999). Durante la formación de reticulocitos se requiere de la condensación progresiva del núcleo para verse como núcleos picnóticos, los cuales puede observarse en necrosis y apoptosis. Estos núcleos se polarizan en la célula y subsecuentemente son extruídos de la célula (Castoldi and Beutler, 1988) para ser fagocitado (Weiss, 1988), la célula pierde por otro lado su capacidad de dividirse (Stenn, 1983; Lavranos et al, 1994). van Wezel et al, (1999), ha encontrado que las células de la granulosa de los folículos atrésicos de la capa media mueren por apoptosis mientras que las más cercanas al antro presentan características de muerte del tipo de diferenciación terminal, mientras que la necrosis se observa hasta estados avanzados de atresia.

2. Necrosis y Apoptosis: son diferentes expresiones morfológicas de una vía ejecutoria común de muerte celular .

La apoptosis ocurre en las células de la granulosa de los folículos de ovarios de ovejas, al menos durante los estados iniciales de la atresia. Sin embargo, se han observado células con características típicas de necrosis, particularmente durante las etapas tardías de atresia (Jolly et al, 1997). La presencia de núcleos picnóticos no puede ser utilizada para

diferenciar entre necrosis y apoptosis puesto ambas tipos de muerte lo muestran (Yang and Rajamahendran, 2000). Sin embargo se puede hablar de varios tipos de muerte de las células de la granulosa que ocurren dentro del proceso de atresia folicular (Hughes and Gorospe, 1991; Tilly et al, 1991, 1992; Peluso et al, 1981; Kovacs et al, 1992, D'Herde et al, 1996; van Wezel et al, 1999; Rosales-Torres. et al, 2000).

Los procesos que pueden llevar a la muerte celular durante la atresia, apoptosis y necrosis, puede ocurrir simultáneamente en las células de la granulosa de los folículos que se consideran como sanos y atrésicos de acuerdo a las observaciones histológicas y a la determinación de la concentración de esteroides en el líquido folicular (Rosales-Torres et al, 2000). Nosotros hemos propuesto que el tipo de proceso de muerte celular que se presenta en un folículo durante la atresia, depende del tamaño folicular: la necrosis se observa con mayor frecuencia entre las células de folículos mayores de 6 mm y la apoptosis en los folículos de 3-6 mm en la oveja (Rosales-Torres et al, 2000).

La necrosis, la apoptosis y la autofagia son considerados conceptualmente y morfológicamente formas distintas de muerte celular. Sin embargo, los aparentes opuestos tipos de muerte pueden ser iniciados por el mismo estímulo, pero la intensidad, y la duración del mismo determinan el tipo de muerte, estímulos menos intensos pueden desencadenar autofagia, mientras que estímulos moderados desencadenan apoptosis y estímulos más intensos provocan necrosis (Dypbukt et al, 1994; Ankarcrona et al, 1995; Bonfoco et al, 1995; Bruck et al, 1997b; Hampton and Orreniuos, 1997; Lemaster et al, 1998; Vayssier et al, 1998; Holtsberg et al, 1998; Li et al, 2000; Chen et al, 2000).

Los diferentes tipos de muerte pueden compartir características bioquímicas similares se ha observado que en fibroblastos a los que se les indujo apoptosis y necrosis son positivos a un anticuerpo monoclonal que reconoce apoptosis (Fernandez et al, 1994). Además Bcl-2 y Bcl-xL pueden suprimir la necrosis y la apoptosis que se induce con hipoxia (Shimizu et al, 1996). La degradación del núcleo en la apoptosis puede implicar la participación de un proceso autofágico (Lu et al, 2001). Tratamientos con calor o estímulos relacionados con la necrosis, producen una disminución de las células que entran al ciclo celular con un incremento en la proporción de células con contenido hipodiploide de DNA que se considera un cambio relacionado con la apoptosis (Dyson et al, 1996; Huschtscha et al, 1994). La necrosis y la apoptosis pueden ocurrir simultáneamente en el mismo tejido o células en cultivo expuesto a estímulos con diferente intensidad (Kerr et al, 1987; Huschtscha et al, 1994; Shimizu et al, 1996; Darzynkiewicz et al, 1997), así mismo la autofagia y la apoptosis pueden ser desencadenadas en el mismo tipo celular pero con diferente estímulo (Chi et al, 1999; Kitanaka and Kuchino, 1999). Estos resultados han permitido proponer que la apoptosis y la necrosis representan los extremos de una sola vía de muerte celular (Lemasters et al, 1998; Renvoizé et al, 1998) que inicia con el proceso referido como permeabilidad transitoria de la mitocondria (PTM) (Columbano, 1995; Zanzami et al, 1997; Lemaster et al, 1998).

3. Mitocondria y PTM.

La membrana mitocondrial interna es una bicapa lipídica (Singer and Nicolson, 1972) compuesta de fosfolípidos y proteínas que se encuentran acomodados asimétricamente (Robertson, 1983). La fosfatidiletanolamina predomina en la cara interna de la membrana que da hacia la matriz mitocondrial, mientras que del lado de la membrana que da al espacio intermembranal predomina la fosfatidilcolina (Krebs et al, 1979).

Las principales funciones de las mitocondrias son: el ciclo de Krebs, la beta oxidación, la fosforilación oxidativa y la síntesis del ATP (Balaban, 1990). Además, son un sitio importante de almacenamiento de calcio (Gunter et al, 1994), son el sitio donde se cataliza la síntesis de progesterona por un citocromo P-450 sec que se localiza en la membrana mitocondrial interna (Tuckey and Holland, 1989) y son generadoras de especies de oxígeno reactivas (ROS) (Boveris and Chance, 1973).

Mitchell (1961) sugirió que la cadena oxidativa está compuesta por una serie de reacciones óxido-reductoras acopladas de tal forma, que los electrones transferidos desde los sustratos de la cadena respiratoria hasta el oxígeno molecular producen una traslocación de protones que genera una diferencia de potencial electroquímico necesario para la síntesis de ATP. Este gradiente electroquímico (González-Halphen, 1990; Sherrat, 1991), conocido como delta Psi mitocondrial ($\Delta\psi$) está constituido por un doble gradiente, el primero es el resultado de la distribución asimétrica de protones y otros iones sobre ambos sitios de la membrana mitocondrial interna, el segundo, Por otra parte, las cargas eléctricas transportadas por los protones a través de la membrana crean una diferencia de potencial eléctrico que da lugar a un segundo componente, el gradiente eléctrico, del potencial electroquímico mitocondrial. Ambos son esenciales para el funcionamiento de la mitocondria (Chen and Smiley, 1993, Reers et al, 1991).

Se ha mencionado que el gradiente electroquímico tiene una influencia sobre la velocidad de transporte de electrones y en consecuencia en la traslocación de protones hacia el espacio intermembranal de la mitocondria, así como en la síntesis de ATP. La bomba de protones del complejo I, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial genera el potencial de membrana mitocondrial interna. La membrana mitocondrial interna se encuentra en estado fluido y todas sus proteínas de membrana y sus componentes redox que catalizan el transporte de electrones y la síntesis de ATP están en constante e independiente movimiento de difusión lateral (Hackenbrock et al, 1986; Chazzote y Hackenbrock, 1991). La velocidad de difusión de los componentes redox tiene una influencia directa en el proceso cinético del mecanismo de transporte de electrones y pueden ser el paso limitante en la síntesis de ATP (Hackenbrock et al, 1986). Se ha sugerido que la difusión de la ubiquinona, que pertenece al complejo III, hacia y desde sus compañeros redox dentro de la membrana interna mitocondrial, constituye el paso limitante en la velocidad del transporte de electrones (Chazzote and Hackenbrock, 1989). Otros estudios han demostrado que dependiendo de la fuerza iónica del medio, el citocromo c puede difundir lateralmente sobre la membrana ya que aumenta su afinidad hacia ésta y difunde poco a la fase acuosa, mientras que al aumentar la fuerza iónica, disminuye su afinidad a la membrana y puede difundirse a la fase acuosa pero en forma lateral regulando la velocidad del transporte de electrones, En la presencia de fuerzas iónicas mucho mayores puede difundir hacia la fase acuosa (Gupte and Hackenbrock, 1988), lo cual puede ser un evento necesario para que se pierda citocromo c de la mitocondria durante el proceso de muerte. Al utilizar algunos ionoforos como Dinitrofenol (Mitchell et al, 1963) que disipan el potencial de membrana mitocondrial, tanto el gradiente electroquímico como el gradiente de concentración, puede acelerar el transporte de protones en la cadena de la fosforilación oxidativa.

Se ha sugerido que el potencial de membrana mitocondrial puede estar influenciado por el secuestro de protones por lisosomas que disminuye el potencial de membrana mitocondrial (Diaz et al, 1999). Esto ha sido apoyado porque al bloquear la V-ATPasa de los lisosomas con bafilomycin A1, que incrementa el potencial de membrana mitocondrial. La presencia en los lisosomas de un canal antipor $\text{Ca}^{+2}/\text{nH}^{+}$ (Calvert and Sander, 1995;

Bode et al, 1996), y al participación del retículo endoplásmico que libera localmente calcio libre y favorece la liberación de protones por los lisosomas, la acidificación local incrementa el potencial de membrana mitocondrial (Diaz et al, 1999).

La liberación de calcio mitocondrial involucra un mecanismo antipuerto que permite la liberación de calcio intercambiado por H^+ o Na^+ . Aunque la mitocondria no contiene grandes cantidades de Ca^{+2} es capaz de movilizarlo en condiciones fisiológicas (Somlyo et al, 1985), puede secuestrar grandes cantidades de calcio citosólico (Carafoli, 1989). Esto aumenta la posibilidad de que pueda actuar como un buffer intracelular durante el daño celular (Kass et al, 1992), la acción buffer contra el flujo de Ca^{+2} la realizan las mitocondrias que se encuentran cerca de la cara interna de la membrana citoplasmica (Diaz et al, 1999) puesto que se han observado poseen alto potencial de membrana mitocondrial (Bobcock et al, 1997), por estar alejadas de la región donde se localizan los lisosomas (Diaz et al, 1999).

La mitocondria ha sido considerada el mayor sitio de producción de ROS in vivo (Boveris and Chance, 1973), principalmente uno de los productos del metabolismo mitocondrial que pueden causar daño celular es el radical superóxido originado por transferencia de electrones al oxígeno molecular; aunque el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria mitocondrial es eficiente, aproximadamente del 98% -99% del oxígeno molecular presente formará H_2O al final de la cadena respiratoria (Hockenbery et al, 1993), existe una pérdida de electrones de la cadena de fosforilación oxidativa que se refleja en la formación de O_2^- (Boveris, 1977). La pérdida de electrones de la cadena de fosforilación oxidativa ocurre a nivel de la coenzima Q, también conocida como ubiquinona, forma parte del complejo III de la cadena de la fosforilación oxidativa (Forman and Boveris, 1982). Otro sitio de transporte de electrones como el reticulo endoplasmico, donde la forma reducida NADPH citocromo P450 reductasa pierde electrones hacia O_2 , reduciendolo a O_2^- (Cross and James, 1991).

El citocromo c, es sintetizado como apocitocromo c por un RNAm codificado por el DNA nuclear de la célula, el cual es exportado al espacio intermembranal de la mitocondria donde una hemoliasa lo divide a holocitocromo c, este paso es irreversible, el holocitocromo c es impermeable a la membrana externa (Neuper, 1997). Las flavoproteínas como el factor inductor de apoptosis (AIF) son sintetizadas como precursores preproteínas en el citoplasma de la célula y son trasladadas dentro de la mitocodria (Susin et al, 1999). Tanto el citocromo c y AIF son confinadas dentro del espacio intermenbranal a menos que se permeabilice la membrana mitocondrial externa (Loeffler and Kroemer, 2000).

La apertura del poro de PT puede tener alguna participación en el proceso fisiológico normal de la célula, puede permitir el intercambio de metabolitos deseables e indeseables (Zoratti and Szabo, 1995, Bernardi, 1996), Puede permitir la liberación de calcio (Ichas et al, 1997), puede participar como señalización de las mitocondrias para ser degradadas por los lisosomas (Vargas et al, 1987, Dunn, 1990), así como la despolarización espontánea de las mitocondrias sufren autofagia, la cual puede aumentar cuando falta alimentos (Elmore et al, 1997).

El descenso del potencial de membrana mitocondrial implica una permeabilidad transitoria de la membrana mitocondrial (Zanzami et al, 1995b; Kroemer et al, 1995) que es consecuencia de la apertura de un megacanal mitocondrial que se conoce como poro de permeabilidad transitorio el cual permite el paso de solutos y algunas proteínas de menos de 1500 Da en ambos sentidos de la membrana mitocondrial interna (Zoratti and Szabó, 1995; Bernardi, 1996). Así mismo, la liberación del citocromo c de la membrana despolarizada es

el resultado de la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial transitoria (PTM) (Hlieden et al, 1997), que puede difundir en ambas direcciones de la membrana mitocondrial durante la apoptosis (Heiden et al, 1997). La apertura del poro puede ocurrir también como consecuencia de la destrucción física de la membrana mitocondrial externa como resultado de la hiperpolarización de la membrana mitocondrial interna y de la edematización de la matriz, lo cual ocurre tempranamente en el proceso de apoptosis (Vander Heiden et al, 1997) o a la desestabilización de la membrana inducida por Bax y Bid (Basanez et al, 1999; Kudla et al, 2000). Por una fuerza iónica, el citocromo c es liberado cuando lo hinchazón mitocondrial rompe a la membrana externa, después del inicio de PTM (Lemaster et al, 1998). Bajo condiciones normales, la membrana mitocondrial interna es casi impermeable a pequeñas moléculas que permite la creación del gradiente de concentración que es necesario para la función mitocondrial (Zaratti and Szabó, 1994; Bernardi et al, 1994). La PTM es acompañada por la hinchazón y el desacople de la fosforilación oxidativa, así como a nivel de la matriz de la pérdida de moléculas de bajo peso molecular como calcio y glutatión (Bernardi et al, 1994; Kroemer et al, 1995; Reed and Savage, 1995) y de factores de muerte que se localizan en el espacio intermembranal como es el citocromo c y Diablo/Smac y caspasas (Tsujimoto and Shimizu, 2000). La proteína Diablo antagoniza los efectos antiapoptóticos de IAPs (Verhagen et al, 2000). El Apaf-1 es un homólogo en los mamíferos del producto del gen *ced-4* de *Caenorhabditis elegans* que se localiza en el citoplasma (Zou et al, 1997). La interacción del citocromo c, Apaf-1 y procaspasa-9 desencadena su activación a caspasa-9 que en turno activa a la caspasa-3 a través de un proceso proteolítico directo (Li et al, 1997b).

Bernardi, (1996) demuestra que PTM es un canal de compuerta de voltaje, la matriz mitocondrial tiene un potencial negativo en el interior cuando está cerrado el poro, mientras que la despolarización abre el poro. La parcial apertura del poro puede iniciar un mecanismo de retroalimentación positiva en la cual la despolarización parcial conduce a una apertura total del poro y por consiguiente el inicio de PTM (Lemasters et al, 1998).

Durante la apoptosis se desacopla el transporte de electrones de la síntesis de ATP, lo que origina la generación de aniones superóxido, como se indica por oximetría (Vayssière et al, 1994) y por detección citofluorométrica de aniones superóxido usando dihydroethidine (Zanzami et al, 1995b). La inhibición del complejo I de la cadena respiratoria o la inhibición de la importación de calcio por rojo de ruterio, resulta en la disminución de la generación de ROS en células con un potencial de membrana mitocondrial bajo. (Kroemer et al, 1995), un descenso en la actividad de complejo I de la cadena respiratoria es acompañado de una disminución del potencial de membrana mitocondrial en el inicio de apoptosis (Chalmers-Redman et al, 1999). El incremento de calcio mitocondrial indica el inicio de PTM (Qian et al, 1996). Diferentes señales que inducen apoptosis, conducen a una disminución del potencial de membrana mitocondrial (Zanzami et al, 1996; Kroemer et al, 1997; Kroemer et al, 1998, Susin, 1998) al mismo tiempo precedida por un incremento transitorio de hiperpolarización (vander Heiden, 1997), mucho antes que la célula muestre fragmentación del DNA (Petit et al, 1995; Zanzami et al, 1995, b; Zanzami et al, 1996; Susin et al, 1996; Wadia, et al, 1998) o una aberrante exposición de fosfatidilserina (Zanzami et al, 1995).

Cuando la PTM involucra a unas cuantas mitocondrias, la autofagia es estimulada, degradando a la mitocondria afectada por los lisosomas y eliminando la señal del estímulo de autofagia, cuando están involucradas más mitocondrias, la PTM promueve la apoptosis, posiblemente porque el mecanismo autofágico se hace inadecuado para contener las

sustancias proapoptóticas liberadas de la mitocondria que muestra PTM, como el citocromo c y AIF. Finalmente, cuando se involucra a todas las mitocondrias, el ATP desciende por el desacople de la fosforilación oxidativa y la hidrólisis del ATP por la ATPasa mitocondrial, Así el descenso en ATP conduce a la muerte de tipo necrótico (Lemasters et al, 1998). la autofagia evita la propagación de PTM, puesto se a observado que PTM que ocurre en una pequeña fracción de mitocondrias progresa hacia las demás mitocondrias lentamente (Limura et al, 1998). La formación de ROS puede ser la causa aunque también puede ser la consecuencia de PTM, además el inicio de PTM en una mitocondria promueve la PTM de otra. Como un proceso autocatalítico (Imberti et al, 1993, Nieminen et al, 1995).

Las proteínas que forman el poro de PTM o megacanal mitocondrial comprenden proteínas del citosol como la hexocinasa; proteínas de la membrana mitocondrial externa como el receptor periférico benzodiazepina (PBR); al porin también conocido como canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC); proteínas del espacio intermembranal, como la creatin cinasa; y una proteína de la membrana mitocondrial interna, la adenina nucleotido traslocator, ANT y cyclofilin D, una proteína de la matrix (McEnery et al, 1992; Zoratti and Szabó, 1995; Bernardi and Petronilli, 1996; Beutner et al, 1996; Brustovetsky and Klingenberg, 1996)

Algunos datos que se han obtenido de mitocondrias aisladas revelan que numerosas sustancias pueden inducir la PTM tales como altas concentraciones de calcio libre (Zoratti et al, 1995), reducción del potencial de membrana mitocondrial que es causa y consecuencia de PTM (Bernardi, 1992; Petronilli et al, 1993), el atractilosido que es un ligando que se une al traslocator de la adenina nucleotido (ANT) (Klingenberg, 1980), uno de los constituyentes del poro de PT (Zoratti and Szabó, 1995, Zamzami et al, 1996), la formación de puentes de azufre por diaminas (Petronilli et al, 1994), la diamina se une a los radicales sulfhidrilo (-SH) de ANT situados en la parte interna del poro y desencadena la PTM (Petronelli et al, 1994, Majima et al, 1994), la oxidación de -SH esta asociado con la apertura del poro de PTM, este efecto puede ser revertido por la reducción de los puentes de azufre (-S-S-) o por la union de -SH con monobromobina (MBB) (Petronilli et al, 1994; Costantini et al, 1995), se ha observado que la N-acetylcysteine puede prevenir el descenso del potencial de membrana mitocondrial (Zanzami et al, 1995, Cossarizza et al, 1995), la N-acetilcisteina tiene un efecto antioxidante directo al reducir directamente a ROS y otro efecto antioxidante indirecto cuando por una deacetylación forma cisteine e incrementa la producción de glutatión (GSH) (Hockenbery et al, 1993), sugiriendo que la formación de puentes disulfuro están involucrados en la apertura del poro mitocondrial (Marchetti et al, 1997)

El glutatión reducido (GSH) es un componente crítico en la red antioxidante celular, Está directamente involucrado en eliminar ROS y mantener a las proteínas intracelulares con radicales -SH en su estado reducido (Liu et al, 2000), la disminución de GSH puede ser un evento en el proceso apoptótico que puede conducir a un incremento de la sensibilidad a apoptosis en diferentes sistemas. La superóxido dismutasa (SOD) con manganeso y cobre-zinc convierte al superóxido a peróxido de hidrógeno (Hockenbery et al, 1993) la MnSOD se encuentra localizada en la matriz mitocondrial (Weisinger and Fridovich, 1973). MnSOD puede proteger contra el factor de necrosis tumoral, la radiación y agentes quimioterapéuticos citotóxicos (Wong et al, 1989; Hirose et al, 1993).

Bcl-2 se encuentra localizado como una proteína integral de la membrana mitocondrial (Hockenbery et al, 1990); aunque se ha localizado también en las membranas externas del retículo endoplasmico y en la membrana nuclear (Chen-Levy et al, 1989;

Jacobson et al, 1993; Monagha et al, 1992). En sistemas libres de células, Bcl-2 puede bloquear la permeabilidad transitoria mitocondrial inducida por una gran variedad de agentes (Zamzami et al, 1996) así mismo puede prevenir la liberación de activadores de caspasas de la mitocondria. La sobreexpresión de Bcl-2 reduce la apoptosis y aumenta el potencial de membrana mitocondrial (Petit et al, 1995; Hennes et al, 1993). La expresión de Bcl-x_L mantiene alto el potencial de membrana mitocondrial al disminuir la eficiencia de la ATPasa que convierte el gradiente de iones H⁺ en ATP o al inhibir la disipación de iones H⁺ del espacio intermembranal. (Heiden et al, 1997). Por lo que Bcl-2 puede inhibir la respiración mitocondrial y prevenir la apertura del poro de PT (Shimizu et al, 1998). La disminución de la respiración mitocondrial puede prevenir la producción de radicales libres, esto puede explicar las propiedades antioxidantes que se le han atribuido a Bcl-2 (Kane et al, 1993; Hockenbery et al, 1993), el descenso en el flujo de electrones a través de la cadena de electrones puede disminuir la producción de O₂⁻ (Shulze-Osthoff, 1992).

La hipoxia induce el metabolismo anaeróbico y la acidosis metabólica que protege contra la despolarización mitocondrial y la permeabilidad transitoria (Lemasters et al, 1998; Jia et al, 1997; Broekemeier et al, 1998), la acidosis protege contra el inicio de la muerte celular en el corazón, riñón e hígado (Gores et al, 1988, Gores et al, 1989). La acidificación intracelular inhibe a la caspasa 3, se requiere de un pH de 7.5 para que la caspasa-3 degrade sus sustratos específicos (Dubrez et al, 1996; Benson et al, 1999). Al restaurar el pH a condiciones normales después de realizar una reperfusión en algunos modelos experimentales se acelera la muerte celular, este fenómeno se conoce como paradoja del pH (Gores et al, 1988, Currin et al, 1991). Tratamientos que disminuyen el pH intracelular durante la hipoxia, como la inhibición del intercambio de Na⁺ /H⁺ con amiloride, retrasan el inicio de la muerte, mientras que tratamientos que incrementan el pH, como la monensina aceleran la muerte (Gores et al, 1988, Gores et al, 1989).

El canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC), es una proteína abundante en la membrana mitocondrial externa que forma un gran poro dependiente de voltaje en la bicapa lipídica y actúa como un mecanismo de regulación del movimiento de sustancias a través de la membrana de la mitocondria (Shimizu et al, 1999). Existe una interacción de bcl-2/bax con VDAC (Carayon et al, 1996; Narita et al, 1998), Bax y Bcl-2 pueden regular la función de VDAC (Shimizu et al, 1999), Bax favorece que VDAC experimente cambios conformacionales que favorezcan la formación de un mega canal permeable al citocromo c, mientras que Bcl-2 mantiene a VDAC normalmente pequeño como para no permitir el paso del citocromo c (Shimizu et al, 1999). Bax y Bak al interactuar con VDAC pueden causar la muerte celular por apoptosis independientemente de señales adicionales (White; 1996), incluso la sobre expresión de Bax puede iniciar la muerte celular por necrosis (Shinoura et al, 1999). Bax y Bcl-x_L se encuentran en el citosol Bax puede trasladarse del citosol hacia la mitocondria induciendo apoptosis (Hsu et al, 1997), mientras que la acción inhibitoria Bcl-x_L en la muerte celular puede realizarse por su unión directa con VDAC (Shimizu et al, 2001) o por interactuar con Apaf-1, que se encuentra en el citoplasma, con lo cual se inhibe la activación de la caspasa-9 (Song et al, 1999). La ceramida C6 disminuye Bcl-x_L y puede reducir la apoptosis causada por pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Metkar et al, 2000). Un descenso de Bcl-2 moderado puede desencadenar la muerte celular por autofagia (Saeki et al, 2001)

Las células pueden generar ATP por la glucólisis y mantener su potencial de membrana mitocondrial normal por el uso del traslocador ADP/ATP para importar ATP en la mitocondria conocido como adenin nucleotido traslocador (ANT) (Skowronek et al,

1992). Algunos estudios muestran que existe una interacción de bcl-2/bax con ANT (Marzo et al, 1998). Cuando Bcl-2 esta unido a ANT este es un canal específico antipuerto de ADP/ATP, pero puede formar un canal no específico en respuesta a Bax (Brustovetsky and Klingenberg, 1996, Rück et al, 1998).

Bcl-xL puede formar canales en membranas lipídicas sintéticas (Schendel et al, 1997; Antonsson et al, 1997). Los canales formados por la familia de Bcl-2 pueden ser descritos como canales de multiconducción (conducción arriba de 1 nS reportado para Bax y Bcl-2), sensible a pH, dependientes de voltage, poco selectivo a iones. Bcl-2 y Bcl-xL son selectivos a cationes, Bcl-2 requiere de un pH ácidos para formar canales, lo cual explica por que a pH ácidos bloquea el inicio de la PMT, mientras que Bax requiere de un pH neutral para formar canales y desencadenar PTM (Antonsson and Martinou, 2000). Los miembros de la familia de Bcl-2 pueden heterodimerizar para formar canales proapoptóticos en la membrana mitocondrial Bad y Bod ligandos proapoptóticos que se encuentra en el citoplasma heterodimeriza con proteínas antiapoptóticas de la membrana mitocondrial como Mcl-1. Las proteínas proapoptóticas Bok que se encuentran en la membrana heterodimeriza con proteínas antiapoptóticas Mcl-1 o Bfl-1 y funciona como canales que regulan la apoptosis (Hsu and Hsueh, 2000).

3.1. Niveles de ATP y ROS en la etapa de decisión del tipo de muerte celular.

Algunos estudios muestran que se requiere la activación de las caspasas para la fase de ejecución de la apoptosis, mientras en la muerte necrótica, deben ser inactivadas (Hirsch et al, 1997; Lemaire et al, 1998a, Li et al, 1998; Denecker et al, 2001). Estos estudios han sugerido que la activación de las caspasas es un elemento de control que determina el tipo de muerte celular. Por otro lado, también se sabe que se requiere de ATP para la progresión de la apoptosis (Eguchi et al, 1997; Leist et al, 1997), al respecto se sugiere que el nivel de ATP es directamente afectado por la actividad catalítica de PARP (poli-(ADP-ribosa) polimerasa), y que durante la apoptosis PARP se divide en dos fragmentos de 25 kDa con N terminal, y otro fragmento de 89 kDa con C-terminal por la actividad de las caspasas (Kaufmann et al, 1993) y justamente esta división es la que permite mantener el ATP necesario en la fase de ejecución de la apoptosis (Herceg and Wang, 1999). La actividad de PARP reduce los niveles de NAD⁺ y resulta en la disminución del ATP celular; Algunos inhibidores químicos de PARP, como 3-aminobenzamida (3AB), previenen la necrosis pero se desencadena la apoptosis (Palomba et al; 1996). En la necrosis hay falla de la respiración oxidativa, y cambios en la permeabilidad mitocondrial y celular (Kroemer et al, 1997, Laszlo and Csaba, 2001). Se ha sugerido que los fragmentos de 25 kDa con N-terminal tienen más afinidad por el DNA, puesto que PARP es catalíticamente activado por el DNA dañado, impide su activación además de inhibir la reparación del DNA por limitar el acceso de enzimas que reparan el DNA. (Kim et al, 2000). La inhibición de las caspasas no previene la apoptosis inducida por drogas, sin embargo no se observa un incremento en la supervivencia de las células, más bien se inicia la muerte celular necrótica (Lemaire et al, 1998). La apoptosis coincide con la liberación de citocromo c de la mitocondria, activación de caspasas, división de proteínas, así como la condensación y fragmentación del DNA. En necrosis no se acompaña por la fragmentación del DNA, activación de caspasas o división de proteínas específicas de caspasas, apesar de la liberación de citocromo c, posiblemente el peróxido de hidrógeno inhibe a las caspasas los niveles de ATP no restauran la actividad de las caspasas (Samali et al, 1999) un evento común observado en la muerte apoptótica y

necrotica es la liberación del citocromo c (Li et al, 1999). en timocitos a los que se induce la muerte necrotica por estres oxidativo, al incrementar se la actividad de PARP pero al inhibir su activación con purinas se incrementa la apoptosis lo que demuestra que PARP es el responsable del descenso de ATP requerido para desencadenar la necrosis (Laszlo and Csaba, 2001).

4. Participación de los lisosomas en la fase de decisión del tipo de muerte celular.

Los lisosomas son organelos intracelulares, con un pH ácido en su interior, que se localizan en todas las células animales cuya función principal es la degradación de macromoléculas celulares (Goldberg and John, 1976; Ohkuma and Poole 1978), en el proceso de autofagocitosis, los lisosomas se fusionan a vacuolas autofágicas que tienen doble membrana, (Ericsson, 1969; de Duve, 1969; Takeshige et al, 1992; Mortimore et al, 1996) así mismo se fusionan a las vacuolas endocíticas las cuales contienen material externo (Silverstein et al, 1977), también pueden participar como almacén de material sin degradar (e Duce, 1969) y regular el potencial de membrana mitocondrial (Diaz et al, 1999). En el ovario, los lisosomas tienen una importante participación en su crecimiento y desarrollo (Dimino et al, 1997), participa en la maduración y la atresia folicular (Ezzel and Szego, 1979; Rahi and Srivastava, 1984; Wise, 1987; Ballesteros et al, 1992; Baños et al, 1996; Rosales 2000), en la regresión del cuerpo lúteo (Smith and Waynforth, 1970) y en la ovulación (Morales et al, 1983; Takenaka et al, 1980; Robker et al, 2000), pueden participar en el metabolismo de hormonas esteroides (Elfont et al, 1977) principalmente a través de una 17 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa que participa en el metabolismo de estradiol a estrona (Entenmann et al, 1980, Gilligan et al, 1986), y de la internalización de gonadotropinas y su receptor (Gilligan et al, 1986; Shimizu and Kawashima, 1989).

Una característica común a todos los lisosomas es que contiene hidrolasas ácidas, se han identificado al menos 60 diferentes enzimas capaces de digerir proteínas (proteasas), ácidos nucleicos (nucleasas), glúcidos (glucosidasas), lípidos (lipasas y fosfolipasas) o fosfatos de moléculas orgánicas (fosfatasas) (Barrret and Heath, 1977) estas enzimas son contenidas en estos organelos, de manera que estas enzimas están separadas de los substratos intracelulares por una membrana previniendo la digestión intracelular sin regular (de Duves 1969).

Las catepsinas pertenecen a las proteasas lisosomales y al menos se han identificado seis géneros de cisteína proteasas como la Catepsin B, L, S, K, C y H las cuales presentan características enzimáticas similares, generalmente participan en la degradación de colágena (Towatari et al, 1991, Katunuma et al, 1999). Mientras que la catepsina D pertenece a las aspártico proteasa lisosomal, la cual está presente prácticamente en todos los animales (Yamamoto 1995).

La estabilidad de los lisosomas en relación a la degeneración celular ha sido material de disputa desde el descubrimiento de estos organelos por Christian de Duve quien consideró a los lisosomas como unas bolsas repletas de enzimas que, de liberarse, destruirían a toda la célula, por lo que provocativamente, les llamó "bolsas suicidas" (de Duve 1959; de Duve 1966; de Duve 1969).

Se considera que en varios estados patológicos, el daño celular puede ser iniciado por la liberación extracelular o intracelular de enzimas lisosomales (Gldstein and Weissman, 1977). La liberación extracelular de enzimas lisosomales que se observa por las células fagocíticas (Bachner et al, 1968; Weissman et al; 1971), en células expuestas al

complejo antígeno-anticuerpo (Davies and Allison 1976) y las células necróticas que se lisan (Van Lancker, 1975), las enzimas lisosomales pueden dañar al tejido periférico y desencadenar una respuesta inflamatoria aguda (Goldstein and Weissman, 1977).

A la fecha, está en debate, si es necesaria la ruptura lisosomal para que ocurra el daño celular. Una serie de experimentos en los que se induce la liberación de enzimas lisosomales como por ejemplo: la que se observa en los macrófagos o leucocitos al fagocitar cristales de urato (Weissman et al, 1971) o partículas de sílice (Allison et al, 1966; Nadler and Goldfischer, 1970); la liberación de enzimas que ocurre por la exposición a metales pesados (Sternlieb and Goldfischer, 1966) o colorantes fotosensitivos (Allison and Young, 1964); a virus (Allison and Mallucci, 1964) y en la isquemia del miocardio (Decker and Wildenthal, 1978). Aunque la ruptura lisosomal ha sido documentada en estos sistemas, las evidencias que sean estas las causas de la muerte son solo circunstanciales, ya que se ha observado que la degeneración celular que ocurre por la fagocitosis de partículas de sílice es una consecuencia de un efecto desestabilizante de la membrana plasmática celular, con la consecuente entrada de iones calcio, y que las enzimas lisosomales liberadas dentro del citoplasma por la ruptura de la membrana lisosomal por sí mismas no son capaces de causar daño a la célula (Kane et al; 1980). También se ha mencionado que los lisosomas muestran una ultraestructura normal y solamente se observan alteraciones en los procesos degenerativos avanzados después del daño irreversible (Slater and Greenbaum, 1965; Trump and Arstila, 1975) y la liberación tardía de enzimas lisosomales simplemente acompañan la remoción enzimática de las células muertas (Van Lancker, 1975). Sin embargo se ha demostrado por estudios ultraestructurales con microscopio de transmisión de electrones que los lisosomas que tienen una membrana intacta pueden filtrar sus enzimas hacia el citosol y producir la muerte celular (Brunk and Ericsson, 1972; Brunk et al, 1972; Brunk et al; 1997; Hellquist et al 1997; Zdolsek et al 1990).

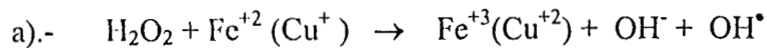
Otras observaciones que se han realizado sobre células en cultivo teñidas con naranja de acridina, una base débil lisosomotrópica lipofílica (AO) (Robbin and Marcus, 1963; Allison and Young, 1964; Zelenin, 1966; Rundquist et al, 1984) que al aceptar protones no puede pasar a través de la membrana lisosomal acumulándose en este organelo (deDuve et al, 1874); han mostrado que existe una relocalización del AO de los lisosomas hacia el citosol antes de la degeneración celular (Zdolsek et al, 1990; Zdolsek, 1993), como una consecuencia de una reacción oxidativa intralisosomal, catalizada por el Fe (II). (Robbins and Marcus, 1963; Allison and Young, 1964; Zdolsek et al, 1993; Zhang et al; 1995; Öllinger and Brunk, 1995; Brunk et al, 1995; Brunk et al, 1995a; b; Zhang et al, 1996; Roberg and Öllinger 1998; Roberge et al, 1999). Sin tener en cuenta el mecanismo de inducción se observa que un moderado grado de ruptura lisosomal resulta en la apoptosis de la célula, mientras que un mayor daño lisosomal termina en la necrosis de la célula (Zdolsek et al, 1993; Brunk et al, 1995b); y cuando la célula se expone a un menor daño lisosomal resulta en una actividad reparativa autofágica (Brunk et al, 1995a; Brunk et al, 1997). Inicialmente, la relocalización del AO es debido a la destrucción del gradiente de protones de la membrana lisosomal, más tarde, sin embargo, se ha observado que es acompañado de la salida de enzimas hidrolíticas lisosomales (Öllinger and Brunk, 1995; Brunk et al, 1995b), las enzimas hidrolíticas pueden por ellas mismas ser constituyente del factor de ejecución de la muerte celular (Brunk et al, 1997).

Se ha postulado que las especies óxido reactivas pueden dañar a la célula a través de la ruptura de la integridad lisosomal y que la menor desestabilización produce alteraciones degenerativas que son reparadas rápidamente y eficientemente por un proceso

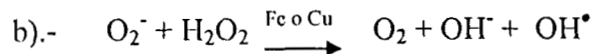
autofagocítico, en un periodo de tiempo corto, pero si el daño a la membrana lisosomal es extenso, la células no sobrevive. (Wilson et al 1987; Zdolsek et al 1990; Zhang et al 1992; Zdolsek et al 1993; Zhang and Brunk 1993; Brunk et al 1995a; Brunk et al 1995b; Zhang et al 1995).

El superóxido O_2^- es un miembro de las especies óxido reactivas que no es liposoluble, y que por sí mismo no causa la peroxidación de lípidos, que es el proceso fundamental para el daño celular; sin embargo O_2^- es convertido a H_2O_2 por acción de la superóxido dismutasa (SOD), el último OH^\bullet que es generado por las dos reacciones catalizadas por metales, como:

la reacción Fenton:

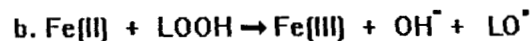
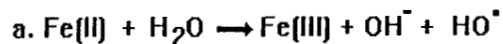


y la de Haber-Weiss:

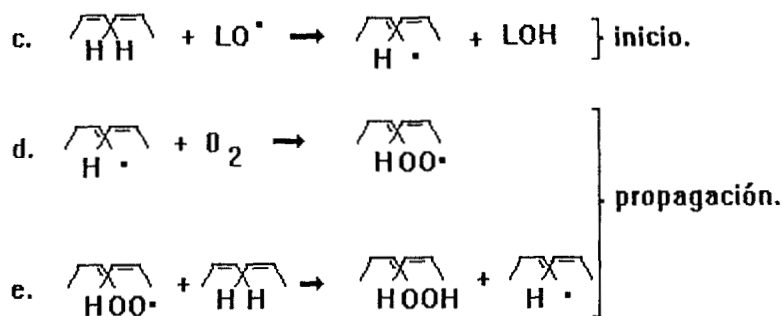


es de las especies oxido reactivas que causa mayor daño oxidativo a macromoléculas que incluyen al DNA, proteínas y lípidos de membranas (Halliwell and Gutteridge, 1989).

El O_2^- puede incrementar la liberación de Fe (II) de las proteínas que contienen este metal, de tal forma que al reducirlo Fe (III) como consecuencia del ataque oxidativo del superóxido sobre estas proteínas; una vez libre el Fe (II) reduce al peróxido de hidrógeno en el inicio de la reacción Fenton, como se observa en el inciso A con la producción de un potente agente oxidante como el radical hidroxilo. El Fe (II) puede ser originado también de la reducción de Fe (III) por un agente reductor celular como el ascorbato y grupos tioles (Keyer et al, 1995; Keyer and Imlay, 1996; Pianzola et al, 1996 Liochev and Fridovich, 1994; Liochev, 1996).



Liochev and Fridovich, (1997) mencionan que las alteraciones que ocurren en la membrana por efecto de ROS depende en una variante de la reacción Fenton, que se observa en el inciso b; donde L denota a un ácido graso poliinsaturado como el araquidónico y que el radical alcoxi (LO^\bullet) generado en esta reacción puede iniciar la oxidación de lípidos poliinsaturados de la membrana por una reacción en cadena de radicales libres que desestabiliza a la membrana (Tappel, 1972; Barclay and Ingold, 1981)



La reacci3n que ocurren de los pasos de b-e son los que causan el da1o a la membrana mitocondrial (Liochev and Fridovich, 1997) y posiblemente la labilizan la membrana lisosomal que puede ser la causa de la degeneraci3n celular por apoptosis o por necrosis (Brunk et al, 1997; Hellquist et al, 1997). Sin embargo bajo condiciones fisiol3gicas el Fe (II) localizado intralissosomalmente (Brunk et al, 1992; Zdolsek and Svensson, 1993; Zdolsek et al, 1993a, b), aumenta la concentraci3n de lipofusina o ceroides (Brunk et al, 1992).

En las c3lulas se han localizados dos tipos de lisosomas los que solo contienen enzimas y que no han participado en procesos digestivos se conocen como lisosomas primarios, mientras que los que contienen materiales en digesti3n es su interior se conocen como lisosomas secundarios estos son los lisosomas vulnerables a las especies 3xido reactivas (Brunk et al 1995a,b; 3llinger and Brunk, 1995; Zhang et al, 1995) como consecuencia de su contenido normal, aunque con peque1as cantidades de Fe (II) (Borg and Schaich 1984; Halliwell and Gutteridge 1985; Starke et al 1985; Starke and Farber 1985; O'Connell et al 1986; Gannon et al 1987; Farber et al 1990; Brunk et al 1992; Zdolsek and Svensson, 1993; Zdolsek et al; 1993a,b) como consecuencia de la autofagocitosis de organelos y proteinas (Ericsson, 1969; Brunk et al, 1992; Mortimore et al; 1996) principalmente de mitocondrias y citocromos (Sakaida et al 1990; Brunk et al; 1992). El Fe(II) puede estar presente en los lisosomas secundarios por un tiempo corto antes de ser transportado hacia el citosol, para ser utilizado en la s3ntesis de nuevas macromol3culas o puede ser almacenado como ferritina; la ferritina, es un complejo de Fe (III) y apoferritina, que es tambi3n sujeta a autofagocitosis. La autofagocitosis de ferritina insaturada provoca que act3e como un quelante de Fe (II) dentro de los lisosomas y, por un instante, deprime la reacci3n oxidativa catalizada por el Fe(II) disminuyendo el da1o lisosomal (Garner et al; 1997; Olejnicka et al; 1997) por lo que se ha considerado como un agente protector del da1o oxidativo (Balla et al 1992; Balla et al 1993). Por otro lado el mecanismo de transporte del Fe(II) del lisosoma hacia el citosol es desconocido, aunque se ha sugerido que algunas mol3culas, como al ADP y citrato, puedan tener acci3n quelante (Crichton and Ward, 1992). Las diferencias sobre la estabilidad de la membrana lisosomal al estr3s oxidativo que se encontraron entre diferentes c3lulas (Zhang et al; 19996; Olejnicka et al; 1997) puede ser el reflejo de diferentes grados de actividad autof3gica entre las c3lulas, lo cual trae consigo diversas cantidades de Fe (II) intralissosomal (Brunk et al 1992).

Se ha sugerido (Sheen y Macklis 1994), que la relocalizaci3n de proteasas lisosomales conducen a la apoptosis Adem3s la concentraci3n de la proteasa cathepsina D se incrementa despu3s de expresarse p53 en c3lulas linfoides durante la apoptosis, mientras

que al administrar peptatina A, un inhibidor específico de catepsina D (Roberg et al, 1999), puede inhibirse la apoptosis, p53 favorece la sobreexpresión de catepsina D (Wu et al, 1998). La relocalización de catepsina D en el citosol ocurre antes de que se inicie el cambio en la permeabilidad mitocondrial y se libere el citocromo c mostrando que es un proceso temprano en el proceso de la apoptosis (Roberg et al, 1999; Neuzil et al, 1999). La catepsina D es un factor de muerte el cual puede activar a la procaspasa-3 incluso puede estimular a que la mitocondria a liberar sus factores apoptóticos (Isahara et al, 1999).

Posiblemente el catepsina B también esta involucrado en la activacion de la caspasa 3, ya que se ha observado que el sobrenadante de la fracción lisosomal tratada con digitonina activa a la caspasa-3 y que inhibidores de la catepsina B como B-64 y leupeptina suprimen esta acción (Ishisaka et al, 1998). Sin embargo otros estudio en el cual se utiliza a las células PC12 y a la cual se le induce apoptosis por la supresión de suero (Batistatou and Greene, 1991) muestran que catepsina B puede aumentar la supervivencia de las células al degradar la catepsina D, a CAD e ICAD así como al grupo de caspasas (Shibata et al, 1998; Isahara et al, 1999), mientras que la catepsina D puede transformarse en un factor desconocido que desencadene la muerte al favorecer la liberación de factores apoptóticos de la mitocondria, esta acción puede ser bloqueada por Bcl-2 (Isahara et al, 1999). En otros experimentos en los cuales se controla la ruptura lisosomal con un detergente lisosomotrofico MSDH que puede protonarse y acumularse solo en el aparato lisosomal (Firestone et al, 1979; Li et al, 2000) si se utiliza a bajas concentraciones desencadena la apoptosis y a altas concentraciones desencadena la necrosis, lo que sugiere que las proteasas lisosomales son necesarias para activar directamente a las procaspasa e indirectamente puede favorecer la liberación de factores proapopticos de la mitocondria (Li et al, 2000). Cuando inicia la apoptosis se ha observado una disminución de catepsina B la cual es inmediatamente acompañada de un incremento de catepsina D (Shibata et al, 1998).

Otras catepsinas que pueden participar en la activación de la procaspasa-3 es la catepsina L, bajo condiciones *in vitro* cuando se adiciona al cultivo de células CLIK-060-181, un inhibidor específico de esta catepsina, se impide o interrumpe la apoptosis (Katunuma et al, 1999), se conoce muy poco de la regulación de esta catepsina y su interacción con la catepsina B y D. Por otro lado se ha demostrado que DNasa lisosomal puede participar en la de gradación del DNA junto con CAD en la fase de degradación de la apoptosis (McLlroy et al, 2000).

Existen múltiples repuestas biológicas a estímulos extra celular que son mediados por la generación intra celular de ceramida (Ballou et al, 1996; Testi, 1996; Kolesnick and Krónke; 1998; Levade and Jaffrézou, 1999). Entre estas respuestas encontramos que la ceramida producida en organelos ácidos a través de la acción de la enzima lisosomal esfingomielinasa ácida desencadena la apoptosis (Hannun, 1996; Obeid et al 1993; Cifone et al; 1994, 1995; Haimovitz-Friedman et al; 1994; Jaffrézou et al, 1996; Verheij et al, 1996; Wright et al, 1996). Sin embargo la ceramida generada por la esfingomielinasa ácida es necesaria pero no suficiente para inducir apoptosis (Higuchi et al 1996), sino que se requiere de la presencia simultanea de ceramida/catepsina D, esto fue demostrado porque el uso del inhibidor de catepsina D, peptatina A o anticuerpos contra el mensajero de catepsina D inhiben la apoptosis (Deiss et al 1996).

JUSTIFICACIÓN.

Literalmente, atresia (término Griego) significa el cierre u obliteración de un orificio o pasaje normal del cuerpo (a=sin; tresos=perforación). Bajo el contexto de la fisiología ovárica la atresia folicular denota un proceso degenerativo por medio del cual se pierden la mayoría de los folículos del ovario durante el desarrollo reproductivo de las hembras (Ryan et al, 1976; Ryan, 1981). La atresia representa un fenómeno fundamental en la biología de la reproducción (Hurwitz y Adashi, 1992) que puede llevar a la pérdida de hasta el 99% de los ovocitos que se encuentran al nacimiento en el ovario en la mayoría de las especies (Tsafirri and Braw, 1984; Hirshfiel, 1991; Hsueh et al, 1996; McGee et al, 1998; Hsu and Hsueh, 1998). A pesar de que se han realizado numerosos estudios sobre este importante fenómeno, hasta el momento no es posible precisar, con exactitud, las causas que desencadenan o determinan la atresia folicular. Puesto que nunca interfiere con la reproducción normal su universalidad permite suponer que es un proceso indispensable para la sobrevivencia de las especies y que por lo tanto debe estar sujeto a una cuidadosa regulación. Algunos autores consideran que es un proceso necesario para que se realice normalmente la maduración (selección(?)) de los ovocitos que deberán ser ovulados (Guthrie et al, 1995; Hsueh et al, 1994; Jolly et al, 1997). Es también importante mencionar que, a pesar de la atención dedicada a este tema por diversos investigadores, no ha sido posible encontrar ningún marcador bioquímico o endocrinológico que permita predecir con certeza cuáles folículos terminarán atrésicos.

La atresia puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo folicular (Mariana et al, 1991) pero es más común en los folículos antrales (Kaipia and Hsueh, 1997; Billing et al, 1996; Chun and Hsueh, 1998). Uno de los eventos más importantes que acompañan al proceso de atresia es la muerte de las células de la granulosa (Byskov, 1978; Hughes and Gorospe, 1991; Tilly et al, 1991; Tilly, 1993; Billig et al, 1994; Chun et al, 1994; Yuan and Giudice, 1997; Breckwoldt et al, 1996; Makrigiannakis et al, 1999) por lo que resulta interesante profundizar en el conocimiento de los mecanismos de muerte celular que participan en la atresia y determinar si estos tienen características particulares de acuerdo al tamaño del folículo y su grado de avance en el proceso atrésico (Rosales-Torres et al., 2000). Además, el papel tan importante que desempeña la muerte celular en muchos de los procesos biológicos fundamentales, hace que el estudio de la muerte por sí misma sea el foco de atención de numerosos grupos de investigación.

Se ha reportado que el mecanismo de muerte que se presenta en las células de la granulosa de folículos durante la atresia es, fundamentalmente, el proceso de apoptosis, mientras que la necrosis participa en las etapas tardías (Tilly et al, 1991; Hughes y et al, 1991; Tilly et al, 1992). Sin embargo existen evidencias que demuestran la participación de más de un tipo de muerte celular en el inicio de la atresia folicular (Peluso et al, 1981; Kovacs et al, 1992; D'Herde et al, 1996; Van Wezel et al, 1999) y recientemente numerosos grupos de investigación han encontrado evidencias que señalan que la muerte por alteraciones en el funcionamiento de los lisosomas, necrosis, desempeña un papel relevante en la producción de la muerte de las células de la granulosa (Besnard et al., 1997; Isahara et al., 1999; Wei-Li et al., 2000) particularmente relacionado con el tamaño de los folículos en los cuales se desarrolla este proceso (Rosales et al, 1999; Rosales-Torres et al, 2000).

Por otro lado en otros modelos se ha mencionado que la muerte celular necrótica y apoptótica pueden desarrollarse simultáneamente en varios tipos de procesos tanto fisiológicos, como patológicos (Kerr et al, 1987; Huschtsha et al, 1994; Darzynkiewicz et al, 1997). Es importante señalar que células sometidas a los mismos estímulos patológicos pueden ser llevadas a la muerte tanto por apoptosis como por necrosis (Darzynkiewicz et al, 1994). En estos casos el momento metabólico en el que se encuentra la célula es el que parece determinar cual de los dos mecanismos de muerte celular será el que predomine (Darzynkiewicz et al, 1994). Desde este punto de vista, se ha demostrado que los factores metabólicos más importantes que participan para definir el tipo de muerte están relacionados con el equilibrio energético de la célula y la disponibilidad intracelular de ATP (Richter et al, 1996; Leist et al, 1997; Tsujimoto, 1997).

Es posible pues considerar que ambos procesos de muerte celular, representan los extremos de una vía única de muerte celular (Fernández et al, 1994; Lemaster et al, 1998; Renvoizé et al, 1998). Células sometidas a tratamientos que dañan las membranas lisosomales pueden iniciar el proceso de muerte celular por necrosis, dependiendo de la magnitud del daño (Zdolsek et al, 1993; Brunk et al, 1995b, 1997; Wei-Li et al., 2000). Por otro lado, procesos que alteran la funcionalidad mitocondrial y modifican los mecanismos de regulación de la permeabilidad transitoria de las membranas de este organelo, determinarán la iniciación del proceso de apoptosis para producir la muerte de la célula (Colombo, 1995; Zanzami et al, 1997; Lemaster et al, 1998).

En este estudio nos proponemos contribuir al conocimiento de la atresia folicular en la oveja y ampliar nuestros conocimientos sobre la participación y la oportunidad con la que se presentan las alteraciones en la funcionalidad de las membranas de los lisosomas y de las mitocondrias en la determinación del tipo de proceso de muerte de las células de la granulosa durante la atresia de los folículos antrales de dos tamaños pre-seleccionados.

HIPÓTESIS.

El tipo de muerte celular que se presenta en las células de la granulosa durante la atresia de folículos antrales en la oveja, depende del tamaño del folículo y de las características funcionales de las membranas de mitocondrias y lisosomas presentes en el momento en que se inicia el proceso de involución folicular.

OBJETIVO GENERAL.

Cuantificar por citometría de flujo las alteraciones de la permeabilidad membranar de las mitocondrias y de los lisosomas en folículos antrales de la oveja seleccionados por su tamaño y por su grado de atresia.

OBJETIVO PARTICULAR.

Determinar la importancia que tiene el tamaño folicular en el tipo de muerte que ocurre en las células de la granulosa durante el proceso de atresia en la oveja.

MATERIAL Y METODOS.

Material biológico.

Se utilizaron ovarios de ovejas no gestantes sacrificadas en el rastro "La Aurora" Estado de México. Los ovarios se trasladaron en una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.01 M pH 7.4 en hielo, hasta el laboratorio de Bioquímica de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, en un lapso no mayor a una hora.

Al llegar al laboratorio los folículos se lavaron dos veces con PBS 0.01 M pH 7.4 frío, se disecaron con unas pinzas de microcirugía con punta roma, y se clasificaron por su tamaño en dos grupos: de 3-6 mm y mayores de 6 mm, y por su grado de atresia en cuatro grupos (1, 2, 3a y 3b) para lo cual se utilizó un microscopio estereoscópico, (magnificación 120X). La clasificación se realizó de acuerdo a los criterios validados por nuestro grupo (Rosales et al, 2000) de acuerdo a los siguientes criterios morfológicos:

-Se clasificaron como atresia 1 aquellos folículos que presentaron abundante irrigación, clara brillantez y en los cuales no era posible observar desprendimientos aparentes de las capas de células de la granulosa.

-En el grupo de atresia 2 estuvieron los folículos que presentaron ligera disminución en su irrigación, disminución en su brillantez y que presentaron pequeños desprendimientos de la capa de las células de la granulosa.

-En el grupo 3 estuvieron los folículos claramente atrésicos. Este grupo se dividió en dos, el 3a donde se incluyeron los folículos con una disminución importante de su irrigación, abundantes desprendimientos de la capa de granulosa y de apariencia grisácea. Finalmente en el grupo 3b se incluyeron los folículos con grandes desprendimientos de la capa de la granulosa, casi nula irrigación y pérdida del complejo ovocito-cumulus.

Se ha demostrado que esta clasificación morfológica se correlaciona adecuadamente con la clasificación histológica de las folículos (Rosales et al, 1990; Ballesteros et al, 1992; Garcia et al, 1997) y la relación hormonal P4/E2 de acuerdo al grado de atresia (Rosales-Torres et al, 2000).

Obtención de las células de la granulosa.

Después de clasificar los folículos se recuperaron por aspiración con reflujó las células de la granulosa suspendidas en el líquido folicular, utilizando una jeringa de insulina con una aguja del número 25. Posteriormente los folículos se abrieron con tijeras de microcirugía y se realizó un raspado suave de sus paredes, utilizando pinzas de punta roma, para recuperar las células de la granulosa que quedaron adheridas en las paredes del folículo. Durante el raspado las células fueron resuspendidas en 200 µl de PBS (0.01 M) pH 7.4 (Ballesteros et al, 1992; Guthrie et al, 1994). Las células obtenidas de estas maneras fueron mezcladas para su posterior procesamiento.

Las suspensiones celulares de cada folículo fueron centrifugadas para recuperar las células (Ballesteros et al, 1992). Considerando que la necrosis y la apoptosis pueden ser inducida por procedimientos bruscos las suspensiones celulares se centrifugaron a una velocidad de 500 X g por 10 min. Las células se resuspendieron finalmente en 600 µl PBS y se tomó una alícuota para determinar la viabilidad celular por tinciones supravitales y para contar las células en una cámara de Neubauer.

Estudio citométrico

A) Determinación de las alteraciones de la permeabilidad de la membrana lisosomal (Traganos and Darzynkiewicz, 1994).

La permeabilidad de la membrana lisosomal se determinó por el uso de Naranja de acridina (AO), una base débil lipofílica que se considera un agente lisosomotrópico (Rundquist et al, 1984). La estimulación lumínica del AO a pH ácido produce fluorescencia roja, mientras que a pH neutro, o alcalino, emite una fluorescencia verde (Darzynkiewicz and Kapuscinski, 1990). El AO tiene la propiedad de que en su estado nativo es capaz de atravesar libremente las estructuras membranales. Sin embargo, a pHs ácidos acepta protones y se carga positivamente lo cual la hace incapaz de atravesar las membranas celulares (de Duve et al, 1974), así que en lisosomas normalmente funcionales el AO se acumula, se carga positivamente y queda atrapado dentro de los lisosomas de las células. La concentración del fluorocromo está determinado por el gradiente de pH de la membrana lisosomal (de Duve et al, 1974). Cuando hay daño en el funcionamiento de los lisosomas, tanto la habilidad de conservar un pH ácido como la permeabilidad selectiva de la membrana lisosomal se alteran, lo cual permite la salida del fluorocromo de los lisosomas hacia el citosol (Brunk et al, 1995b).

De acuerdo con lo propuesto por Traganos y Darzynkiewicz (1994) si se utilizan concentraciones bajas de AO ($<10^{-5}$ M) este fluorocromo se puede unir en forma monomérica a los ácidos nucleicos de las células vivas, mientras que los lisosomas concentran selectivamente el colorante y producen la formación de agregados. La acidez del pH normalmente presente dentro de los lisosomas, así como la formación de agregados aumenta la producción de fluorescencia del AO en el rango rojo del espectro. Bajo estas condiciones de concentración sólo las células vivas, con lisosomas adecuadamente funcionales acumulan colorante en estos organelos permitiendo determinar este funcionamiento normal por la emisión de fluorescencia roja, mientras que los lisosomas alterados no solo permiten la salida de AO, sino que evitan la producción de fluorescencia roja.

Siguiendo la metodología propuesta por Traganos and Darzynkiewicz (1994) se preparó una solución concentrada (1mg/ml) en agua destilada de Naranja de Acridina (AO) altamente purificada obtenida del laboratorio Polysciences Inc (Warrinton, P.A.). La solución se almacenó a 4 °C hasta su uso. A una alícuota de 10^6 células de la granulosa se le adicionó AO (1 µg/ml) y se incubó a 37 °C por 30 min. Después de este tiempo se analizaron 10,000 células en un citómetro de flujo Becton Dickinson Systems, San José, Ca. equipado con lámpara laser de argón que emite una luz de excitación a 488 nm, utilizando el programa Lysys II. El valor mínimo de FSC-H fue de 44 y la ganancia para FSC de E00. La emisión se leyó como fluorescencia roja utilizando un filtro que permite el paso de longitudes de onda > 640 nm. La intensidad de fluorescencia se registro en forma logarítmica. La referencia de fluorescencia intrínseca o negativa, se estableció con una muestra sin el fluorocromo.

B) Determinación de las modificaciones de la permeabilidad transitoria de la membrana mitocondrial (Darzynkiewicz, et al 1994).

Para medir los cambios en el potencial de la membrana mitocondrial se utilizó la Rodamina 123 (Rh123) que es un fluorocromo lipofílico que se ha utilizado para

monitorear variaciones en el potencial de membrana mitocondrial. Este fluorocromo emite una fluorescencia verde (Leprat et al, 1990). Rh123 es específico para mitocondrias ya que no es concentrado apreciablemente por otros organelos como los lisosomas o las vesículas endocíticas. El Rh123 tiene carga positiva a pH fisiológico, cruza la membrana mitocondrial y es atraído por la carga negativa de la matriz mitocondrial (Johnson, 1980, Johnson et al, 1981). Cambios en el potencial de membrana se reflejan por cambios en la concentración del fluorocromo, fenómeno que se conoce como señal de redistribución (Cohen and Salzberg, 1978).

En este trabajo se siguió la metodología propuesta por Darzinkiewicz, et al (1994). Se preparó una solución concentrada de Rh123 (Eastman Organic Chemicals) (1 mg/ml) en agua bidestilada, 5 μ l de esta solución se adicionaron a una alícuota conteniendo 10^6 células de la granulosa suspendidas en 1 ml de PBS 0.01M pH 7.4. La suspensión se incubó a 37 °C por 30 min en una cámara de incubación con CO₂ (Johnson et al, 1980). Posteriormente las células de la granulosa se lavaron dos veces con PBS 0.01 M pH 7.4 antes de realizar la medición en el citómetro de flujo (Darzinkiewicz, et al., 1994).

Después de incubar y lavar el exceso de fluorocromo se analizaron 10,000 células de la granulosa en el citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson System, Mountain View, CA, USA) con un láser de argón usando el programa Lysys II. La fluorescencia de la rodamina 123 se midió por excitación a 488 nm y se determinó la emisión en el rango de fluorescencia verde de 530 \pm 20 nm. La FL1 se adquirió en forma logarítmica, se establecieron las regiones de fluorescencia sobre los histogramas de cada muestra y se solicitó al citómetro el análisis estadístico de cada muestra de donde se obtuvo el porcentaje de células en cada región.

Los resultados del estudio citométrico, para ambos fluorocromos se analizaron de la siguiente manera: para el fluorocromo AO, se obtuvo el patrón de intensidad de fluorescencia en relación con la distribución de las células que emitieron fluorescencia roja (FL3+) de cada muestra y de esta distribución se determinó el cambio en la permeabilidad lisosomal relacionado con el tamaño del folículo y el estadio del proceso de atresia. Para el caso de la Rodamina 123, se consideraron células con permeabilidad mitocondrial alterada aquellas que tuvieron modificaciones significativas en el patrón de fluorescencia FL1.

Análisis Estadísticos.

Los resultados se agruparon de acuerdo al tamaño folicular y al grado de atresia. De los trazos obtenidos se cuantificaron, por integración (pesaje), los valores de las áreas bajo las curvas. Se obtuvieron promedios y desviaciones estándar de las células fluorescentes en cada uno de los picos principales del patrón de fluorescencia en relación tanto a la intensidad total de fluorescencia como al número de células que integró cada uno de los picos. En el caso del marcaje con AO a los datos se les hizo una transformación logarítmica que mejoró las propiedades de la distribución de dicha variable para utilizar un modelo de distribución normal en el análisis de los datos. Para el análisis estadístico de las células teñidas con rodamina 123 se utilizaron los datos sin transformar.

Los resultados se analizaron por Andeva de 2 vías y las diferencias por prueba de Tukey.

El modelo estadístico usado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + T_j + GT_{ij} + E_{ijk}$$

- Y_{ijk} = Es la variable de estudio (permeabilidad lisosomal y mitocondrial)
 μ = Es la media general
 G_i = Representa el i-ésimo efecto del grupo folicular (grado de atresia clasificado microscópicamente)
 T_j = Representa el j-ésimo efecto del tamaño folicular
 GT_{ij} = Representa el efecto de interacción entre el i-ésimo efecto de grupo folicular con el j-ésimo efecto del tamaño folicular
 E_{ijk} = Error aleatorio o residuo.

RESULTADOS.

Puesto que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) entre los resultados de folículos con atresia 3a y 3b, los datos de ambos grados de atresia se combinaron formando un solo grupo al que en adelante se le denominará folículos con atresia avanzada.

En prácticamente todos los casos de atresias tipos 1 y 2 el 100% de las células mostraron una fluorescencia $> 10^2$ (Figs. 1-4), mientras que en todos los casos de atresias avanzadas hubo un número importante de células con intensidades de fluorescencia $< 10^2$. Una gráfica típica del patrón de fluorescencia encontrado con el uso de AO para identificar células de la granulosa con permeabilidad lisosomal anormal en folículos de 3-6 mm de diámetro en diferentes estadios de atresia se muestra en la figura 1. Puede observarse que tanto el patrón general de distribución de las células, como la intensidad de fluorescencia y el número total de células fluorescentes se modifican conforme avanza el proceso de atresia. En efecto las células con atresia 1 muestran un patrón de distribución uniforme con fluorescencia intensa. En la atresia 2 el patrón se torna bimodal y el pico principal es significativamente menos fluorescente que en la atresia 1. En la atresia 3 existen numerosos grupos de células con intensidad de fluorescencia consistentemente menor que en los otros dos grupos. La gráfica 2 muestra el patrón típico de fluorescencia en las células de folículos > 6 mm. En este caso las células obtenidas de folículos de tipo 1 (no atrésicos) muestran también un patrón homogéneo con fluorescencia intensa, mayor que la observada en los folículos de 3-6 mm. La disminución de la intensidad de fluorescencia en el caso de los folículos con atresia tipo 2 es realmente notable (10 veces menor), mientras que en el caso de la atresia 3 lo notable es la presencia de un gran número de células (45%) con fluorescencia casi nula. Como se muestra en la figura 3 aunque persiste la tendencia hacia la disminución en la intensidad de fluorescencia y a la fragmentación de las células teñidas en grupos diversos, las diferencias en el patrón de fluorescencia obtenidas con células de la

granulosa de folículos de 3-6 mm incubadas con rodamina son menos dramáticas y en el caso de los folículos > 6 mm la disminución en la intensidad de fluorescencia solo es advertida en los folículos con atresias avanzadas. Es sorprendente notar que en el caso de la atresia 2 la fluorescencia de las células de la granulosa tiende a ser mayor, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 4 y Cuadro 3), que la intensidad de fluorescencia de las células obtenidas de folículos no atrésicos. También es importante hacer notar que en general las intensidades de fluorescencia observadas en los folículos > 6 mm fueron significativamente mayores que las proporcionadas por las células obtenidas de folículos de 3-6 mm de diámetro.

Cuando el análisis de permeabilidad lisosomal y mitocondrial se realizó sólo comparando la intensidad media del pico principal de fluorescencia en folículos sanos y atrésicos (Cuadro 1), los resultados mostraron que en los folículos de 3-6 mm la permeabilidad lisosomal presentó diferencias significativas entre folículos sanos y atrésicos de los dos tamaños estudiados. En los folículos pequeños (3-6 mm) se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la intensidad de fluorescencia de las células marcadas con rodamina mostrando que los folículos atrésicos pequeños manifiestan claramente un déficit en el número de células con permeabilidad mitocondrial normal. El comportamiento de la permeabilidad de lisosomas y mitocondrias en los folículos > 6 mm tuvo un comportamiento diferente. En estos folículos de mayor diámetro no hubo diferencia significativa entre la permeabilidad mitocondrial de folículos sanos y los folículos con atresia inicial y, en cambio, sí la hubo ($p < 0.05$) para la intensidad media de fluorescencia del AO, indicando alteraciones tempranas de la permeabilidad lisosomal en los folículos grandes.

Cuando se determinó el impacto de la interacción de las variables estatus (atrésicos, sanos) y tamaño folicular, sobre la permeabilidad lisosomal (Cuadro 2) no se encontraron diferencias significativas entre los folículos sanos de ambos tamaños, pero se encontró un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.047$) de esta interacción en los folículos con cualquier grado de atresia. Es, sin embargo, importante mencionar que esta diferencia mostró una divergencia de la funcionalidad lisosomal dependiente del avance del estado de atresia en los folículos pequeños (3-6 mm) (% de células con fluorescencia roja sanos > folículos de Atresia 2 > folículos de Atresia 3), mientras que en los folículos > 6 mm los folículos más afectados fueron los de tipo 2 (% de células con fluorescencia roja sanos > folículos de Atresia 3 > folículos de Atresia 2).

Con respecto a las modificaciones de la permeabilidad mitocondrial, también se pueden ver cambios con respecto al tamaño folicular y al grado de atresia (Cuadro 3). En los folículos de 3-6 mm hay una disminución clara del porcentaje de células que muestran una intensidad de fluorescencia $< 10^3$ en relación con el grado de atresia. Sin embargo en los folículos > 6 mm sólo existe diferencia estadísticamente significativa entre los folículos sanos y los folículos con atresia 3 ($p < 0.01$), lo cual indica un importante disminución de la funcionalidad mitocondrial en las células de la granulosa de folículos con atresia avanzada, pero no en los folículos en que se inicia la atresia (tipo 2).

DISCUSIÓN.

Existen dos prototipos característicos de vías de muerte: la apoptosis y la necrosis. La apoptosis es un proceso altamente conservado que puede ser inducido por una gran variedad de condiciones fisiológicas y patológicas y en la que las mitocondrias juegan un papel crucial. La muerte apoptótica es precedida por una disminución en el potencial transmembranal de la mitocondria ($\Delta\psi_m$) y por la liberación del citocromo *C* desde el espacio intermembranal de la mitocondria (Liu X et al 1996) hasta el ambiente citoplásmico. Se ha demostrado que la liberación del citocromo *C* y la disminución de $\Delta\psi_m$ son mediadas por la proteólisis de Bid producido por la activación de la caspasa 8. Bid es un miembro de la familia del Bcl-2 o factor activador de caspasas (Steemans et al 1998). El citocromo *C* citosólico junto con modificaciones en la razón ATP/ADP inducen el cambio conformacional del factor activador 1 de proteasas apoptóticas o Apaf-1, seguida de la dimerización de la procaspasa-9, en el complejo metabólico también llamado apoptosoma, el cual produce la activación proteolítica de la procaspasa-9 (Zou et al 1998). La caspasa 9 activa a la caspasa 3 ejecutora. Esta última, una vez activada es también reclutada en el complejo del apoptosoma (Hu et al 1999).

La liberación de los factores pro-apoptóticos desde la mitocondria es determinada por la alteración de la permeabilidad de las membranas de la mitocondria, fenómeno al que se le conoce como modificación de la permeabilidad mitocondrial transitoria (PTM) (Shimizu et al, 1999; Lemaster et al, 1998). En este trabajo se puede observar claramente que durante la atresia folicular de la oveja se modifica la permeabilidad de las estructuras membranosas de las mitocondrias en las células de la granulosa y que esta alteración de la permeabilidad parece ser más importante en los folículos pequeños (3-6 mm), en cuyo caso el daño a las mitocondrias aumenta conforme avanza el proceso de atresia folicular. Aunque las diferencias en los folículos > 6 mm no son estadísticamente significativas cuando se comparan los folículos sanos con los que presentan atresia temprana, en los folículos con atresia más avanzada, se observa el menor porcentaje de células con funcionalidad mitocondrial normal.

Las alteraciones en la permeabilidad mitocondrial que se demuestra aquí confirma la participación mitocondrial en el proceso de muerte celular por apoptosis en la atresia folicular de la oveja, que ha sido sugerido por otros autores, (Tilly et al 1992; Rosales-Torres et al., 2000), así como en otras especies, (Hsueh et al 1994).

Como se observa en el cuadro 3, en el que se presenta el resultado del análisis de la funcionalidad membranal de la mitocondria en relación con el grado de atresia y el tamaño folicular, hubo un efecto estadísticamente significativo de esta interacción sobre el porcentaje de células con cambios en la permeabilidad mitocondrial que fue más importante en los folículos de 3-6 mm de diámetro, lo cual indica que en los folículos pequeños el grado de atresia está más directamente relacionado con la función mitocondrial. Cuando el análisis se realizó solo comparando la permeabilidad mitocondrial entre folículos sanos y atrésicos en folículos > 6 mm, los resultados que se presentan en el Cuadro 3 demuestran que el porcentaje de células con alteraciones en la permeabilidad mitocondrial es solo significativa estadísticamente entre los folículos sanos y los folículos con atresia avanzada (tipo 3).

El porcentaje de células que muestran cambios en la permeabilidad y la funcionalidad de los lisosomas indica que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre folículos sanos y atrésicos. Esta diferencia es particularmente clara entre los folículos > 6 mm pertenecientes a los tipos de atresia 1 y 2. La ausencia de cambios significativos de la permeabilidad mitocondrial entre estos dos tipos de folículos parece indicar claramente que en los folículos de este tamaño la alteración de la permeabilidad lisosomal puede ser el origen de la muerte que se produce en las células de la granulosa de estos folículos. En algunos modelos de inducción de muerte por daño a los lisosomas, se ha visto que esto es capaz de iniciar la muerte celular al activar directamente a las caspasas o indirectamente al estimular a la mitocondria para que libere factores que activan las caspasas (Li et al, 2000, Chen et al, 2000).

Este trabajo presenta una importante evidencia de la participación de más de un tipo de muerte celular en la atresia, tal como ocurre de otros sistemas de células (Li et al., 2000). En la atresia folicular de la oveja ya había sido sugerido previamente por nuestro grupo (Rosales et al 2000) y por otros grupos en las aves (Kovacs et al 1992; D'Herde et al 1996) y en el cerdo (Besnard et al., 1997). Además también resalta que el tipo de muerte predominante está determinado principalmente por el tamaño. Nuestros resultados demuestran claramente que en los folículos de 3-6 mm los cambios observados en el porcentaje de células con alteraciones de la permeabilidad lisosomal, como indicador de muerte necrótica, son menos importantes que los observados en los folículos > 6 mm. Si comparamos estos resultados con los observados en el caso de la funcionalidad mitocondrial, como evidencia de muerte apoptótica, el comportamiento de acuerdo al tamaño de los folículos fue al revés, ya que fueron los folículos de 3-6 mm los que presentaron un cambio estadísticamente significativo en el porcentaje de células con alteraciones de la función mitocondrial.

La presencia simultánea de varios tipos de muerte celular en las células de la granulosa durante la atresia folicular ha sido previamente establecido. Kovacs et al (1992), sugirieron que la necrosis es la forma de muerte dominante en los folículos atrésicos de la gansa. D'Herde et al (1996) observaron 3 vías de muerte celular, apoptosis, necrosis y autofagia durante la atresia de los folículos de la codorniz.

Recientemente ha quedado claro que dependiendo del contexto metabólico en que se encuentran las células de la granulosa puede iniciarse la muerte celular por necrosis o por apoptosis. La intensidad de un mismo estímulo puede decidir la prevalencia de necrosis o apoptosis (Vantieghem et al 1998). Además, la caída del contenido de ATP puede convertir un estímulo inicialmente apoptogénico en uno necrogénico (Leist et al 1997).

Nuestros resultados indican que igual que se ha establecido en algunos otros sistemas, la muerte en las células de la granulosa durante la atresia es iniciada por un mecanismo común, que depende de la alteración del potencial transmembranal mitocondrial y de los cambios en el potencial energético de las células (Lemasters et al 1998; Renvoizé et al 1998). En los folículos pequeños, donde la disminución del flujo sanguíneo es insuficiente para producir hipoxia en las células de la granulosa (Murdoch 1992), la atresia básicamente se inicia y progresa por el mecanismo de la apoptosis (Leist et al 1997; Tsujimoto et al 1997). La disminución del flujo sanguíneo en los folículos grandes > 6 mm puede ser suficiente para comprometer la oxigenación tisular y consecuentemente la producción de ATP. En estos casos el compromiso metabólico parece determinar

alteraciones en el funcionamiento de los lisosomas, los cuales modifican su selectividad membranal produciendo la necrosis como la vía de muerte más importante en las células de la granulosa de estos folículos. Lo que queda claro en este estudio es que el daño lisosomal que presentan las células de los folículos de mayor diámetro no es consecuencia del daño mitocondrial puesto que en los cuadros 2 y 3 podemos ver que no hay cambios importantes en la funcionalidad mitocondrial entre folículos atrésicos y sanos de diámetro > 6 mm, mientras que los cambios en la funcionalidad de los lisosomas son francamente aparentes, lo cual indica que la necrosis en estos folículos sería la causa primaria de muerte.

Otra posible explicación del daño lisosomal, sin daño aparente de la mitocondria, en las células de la granulosa de los folículos > de 6mm es el incremento del estrés oxidativo consecuencia de la mayor demanda que produce la necesidad de aumentar la esteroidogénesis en estos folículos. Los requerimientos metabólicos para estimular fuertemente este proceso pueden redundar en la formación anormal de especies óxido reactivas. Cuando el NAPH pierde electrones hacia O_2 para formar O_2^- y este no es liberado a la P450 reductasa (Cros and Jones, 1991) pueden generarse cantidades importantes de radicales libres dentro de la célula. La presencia de estos radicales libres puede causar daños importantes a la membrana lisosomal. Se ha reconocido recientemente que la formación acelerada de especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden inhibir la actividad de las caspasas (Samali et al, 1999) y permeabilizar la membrana lisosomal (Brunk et al, 1997; Hellquist et al, 1997, Nilsson et al, 1997). Algunos autores han demostrado que los lisosomas pueden contener factores que pueden desencadenar la activación de factores de muerte como catepsina D (Isahara et al, 1999) y posiblemente catepsina B (Ishisaka et al, 1998) que activan a la caspasa 3 o pueden inducir la liberación de factores apoptóticos a partir de la mitocondria (Isahara et al, 1999).

Cuadro No. 1

Permeabilidad lisosomal y mitocondrial por tamaño y grado de atresia indicada por la intensidad media de fluorescencia de las células de la granulosa incubadas con AO o con rodamina 123.

Tamaño en mm.	Grado de atresia	Intensidad media de fluorescencia	
		OA	Rodamina
3-6	1	^a 10 ^{3.2}	^a 10 ^{2.7}
3-6	2	^b 10 ^{2.6}	^b 10 ^{2.2}
3-6	3	^{b,c} 10 ^{2.2}	^b 10 ^{2.2}
>6.	1	^a 10 ^{3.4}	^a 10 ^{3.2}
>6.	2	^b 10 ^{2.5}	^a 10 ^{3.2}
>6.	3	^c 10 ^{2.1}	^b 10 ^{2.4}

^{a, b, c} Letras diferentes indican la presencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de la misma columna.

Cuadro No. 2

Intensidad de Fluorescencia Observada en Células de la Granulosa Obtenidas de Folículos Sanos y Atrésicos Incubadas con AO.

Tipo de Atresia	N	Promedio y DS del % de células con fluorescencia $\geq 10^3$	
		Tamaño 3-6 mm	Tamaño > 6 mm
1	7	83.1+16.1 ^a	95.9+8.3 ^a
2	7	*23.5+6.1 ^b	9.2+5.0 ^b
3	8	*6.2+3.0 ^c	26.6+13 ^c

^{a, b, c} Letras diferentes indican la presencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de la misma columna.
 * indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre folículos de diferente tamaño.

Cuadro No. 3

Intensidad de Fluorescencia Observada en Células de la Granulosa Obtenidas de Folículos Sanos y Atrésicos Incubadas con Rodamina 123.

Tipo de Atresia	N	Promedio y DS del % de células con fluorescencia $>10^3$	
		Tamaño 3-6 mm	Tamaño >6 mm
1	8	*46.2±7.2 ^a	67.8±13.4 ^a
2	5	*11.2±5.2 ^b	77.5±10.3 ^a
3	10	*4.2±2.2 ^c	17.6±15.8 ^b

^{a, b, c} Letras diferentes indican la presencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de la misma columna.

* indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre folículos de diferente tamaño.

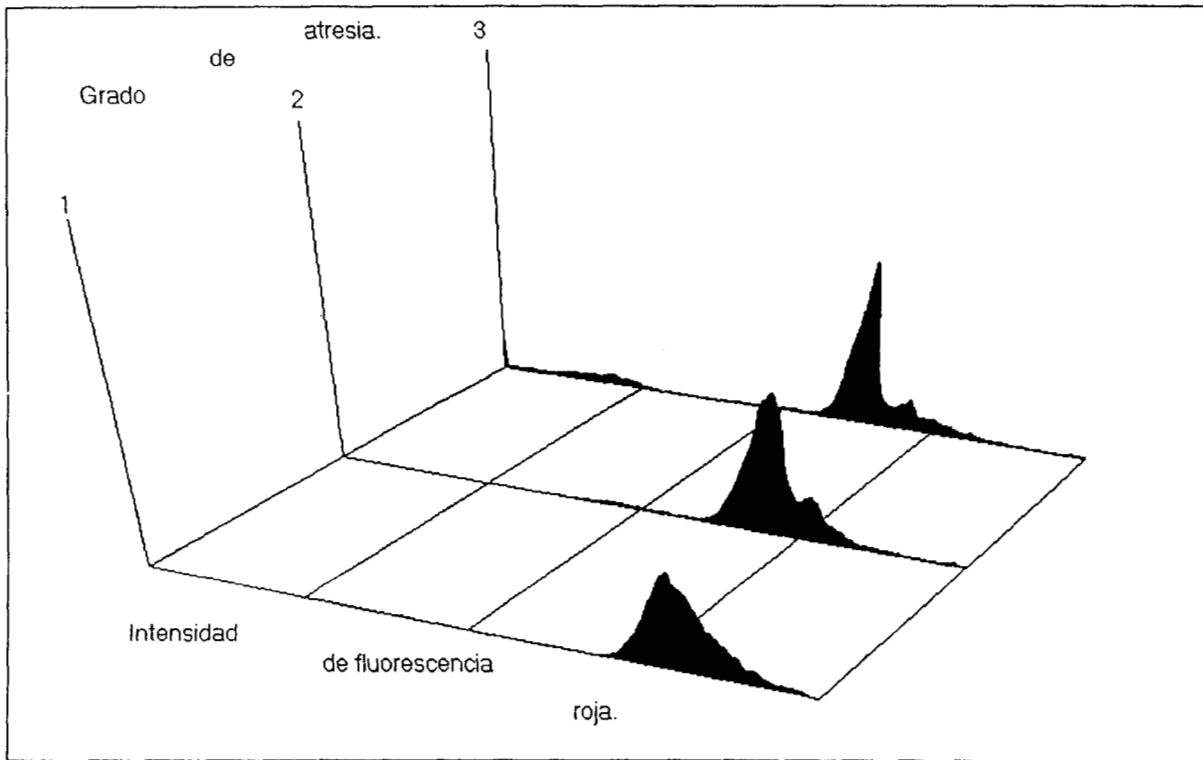


Figura 1. Patrón de fluorescencia de células de la granulosa incubadas con AO procedentes de folículos de oveja de 3-6 mm de diámetro con tres grados de atresia. El patrón de distribución de las células, así como la intensidad de fluorescencia se modificó conforme avanza el proceso de atresia. Las células de folículos con atresia 1, muestran un patrón de distribución uniforme con fluorescencia intensa. En la atresia 2 se torna bimodal y el pico principal es significativamente menos fluorescente que en la atresia 1. En la atresia 3, se pueden ver grupos de células con menor intensidad de fluorescencia que en los otros dos grupos.

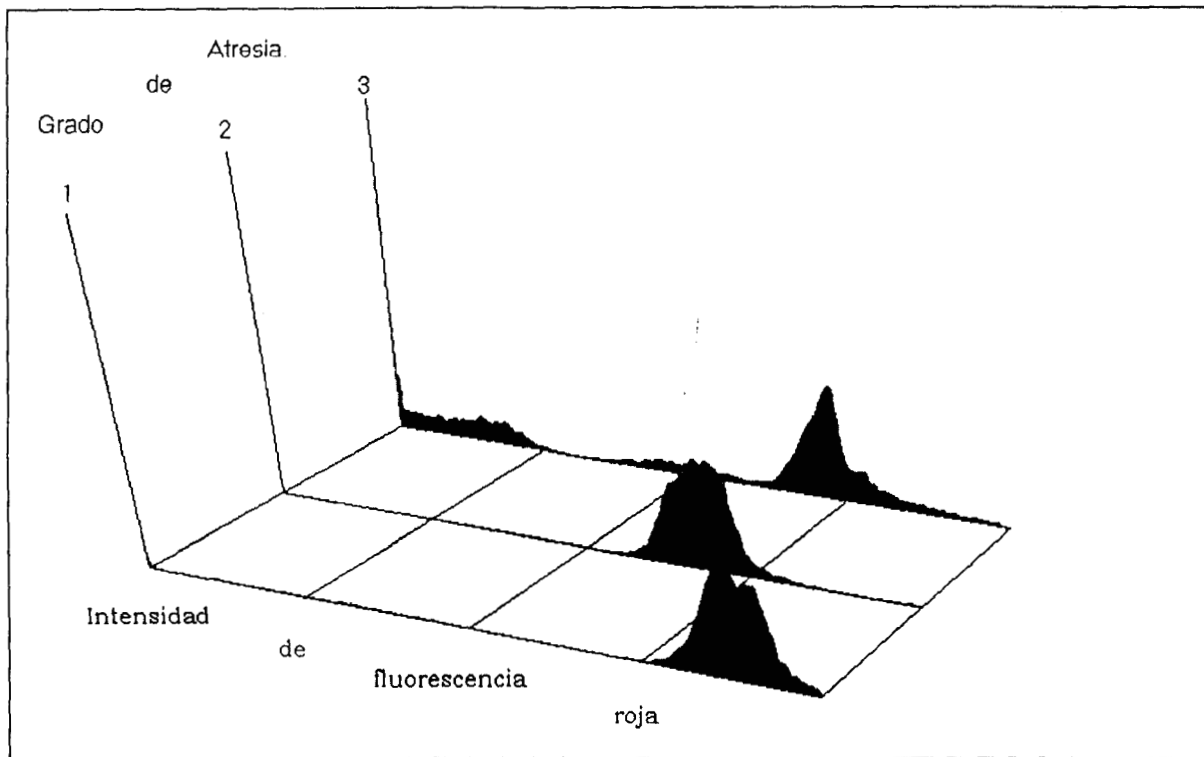


Figura 2. Patrón de fluorescencia de células de la granulosa incubadas con AO procedentes de folículos de oveja >6 mm de diámetro con tres grados de atresia. Las células obtenidas de folículos con atresia 1 (sanos) muestran un patrón homogéneo con fluorescencia intensa. La intensidad de fluorescencia en los folículos con atresia 2 es 10 veces menor que la que muestran las células de folículos con atresia 1. En la atresia 3, el 45% de las células tienen una intensidad de fluorescencia entre baja y nula.

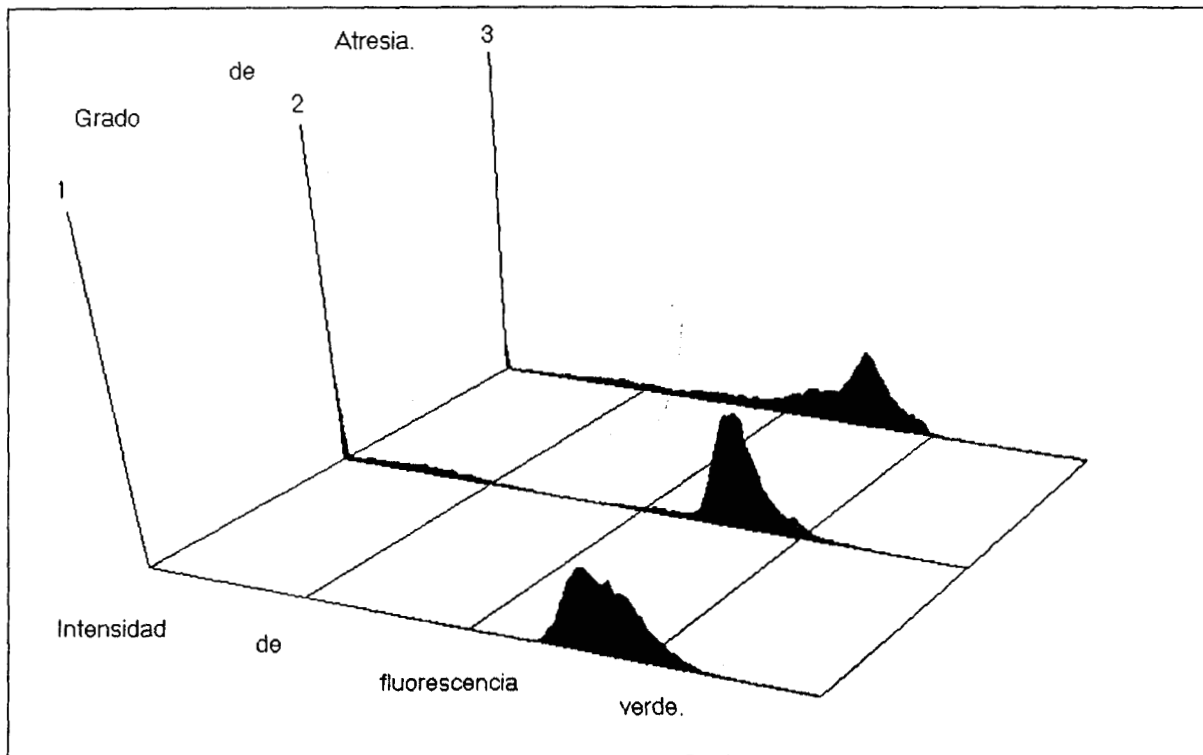


Figura 3. Patrón de fluorescencia de células de la granulosa tratadas con Rh 123 procedentes de folículos de oveja de 3-6 mm de diámetro con tres grados de atresia. En esta figura se puede ver una tendencia a la disminución de la intensidad de fluorescencia de acuerdo al grado de atresia, así como a la formación de grupos de células con intensidad disminuida.

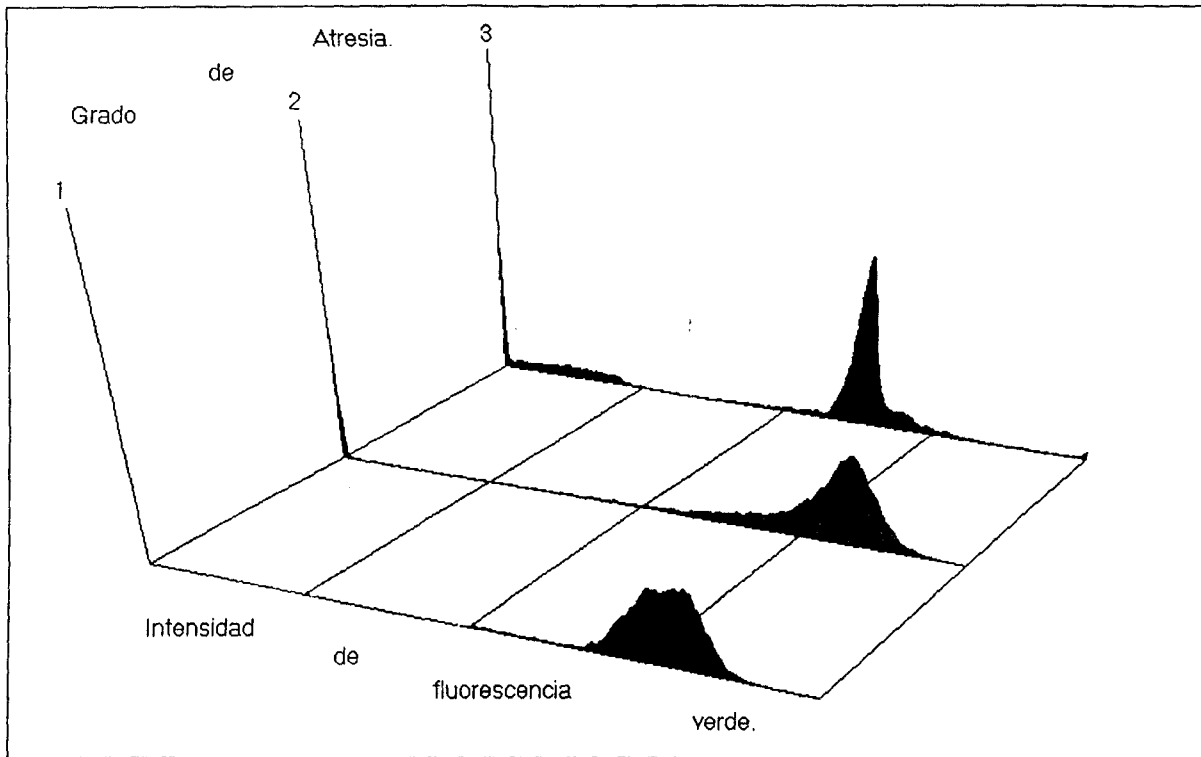


Figura 4. Patrón de fluorescencia de células de la granulosa tratadas con Rh 123 procedentes de folículos de oveja >6 mm de diámetro con tres grados de atresia. En este diámetro folicular, sólo hubo una importante disminución en la intensidad de fluorescencia en la atresia 3.

BIBLIOGRAFIA.

- Ackerman, R.C. and Murdoch, W.J. 1995. Prostaglandin-induced apoptosis of ovarian surface epithelial cells. *Prostaglandins*; 45475-485.
- Acton, S.L., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., Krieger, M., 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 271: 518-520.
- Acton, S.L., Scherer, P. E., Lodish, H.F., Krieger, M. 1994. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem*; 269:21003-21009.
- Adashi, E.Y. 1994. Endocrinology of the ovary. *Human Reprod*; 5:815-827.
- Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Croft, C.S. and Payne, D.W. 1989. Tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin hormonal action in nontransformed ovarian granulosa cells. A modulatory non-cytotoxic property. *J Biol Chem*; 264:11591-11597.
- Adashi, E.Y., Resnick, C.E., D'Ercole, A.J., Svoboda, M.E. and Van Wyk, J.J. 1985. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev*; 6:400-420.
- Adashi, E.Y., Resnick, C.E., Hernandez, E.R., Hurwitz, A. and Rosenfeld, R.G. 1990. Follicle-stimulating hormone inhibits the constitutive release of insulin-like growth factor binding protein by cultured rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology*; 126:1305-1307.
- Afanasyev, V.N., Korol, B.A., Mantsygin, Y.A. Nelipovich, P.A., Pechatnikov, V.A., Umansky, S.R. 1986. Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS Lett*; 194:347-350.
- Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B. and Stark, G.R. 1998. The p53 network. *J Biol Chem*; 273:1-4.
- Ahmed, C.E; Dees, W.L. and Ojeda, S.R. 1986. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* 118:1682-1689.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J. Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A. Wong, W.W. and Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*; 87:171.
- Allison, A.C. and Young, M.R. 1964. Uptake of dyes and drugs by living cells in culture. *Life Sci*; 3:1407-1414.
- Allison, A.C., Harington, J.S., Birbeck, M. 1966. An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. *J Exp Med*; 124:141-154.
- Allison, A.C., Mallucci, L. 1964. Histochemical studies of lysosomes and lysosomal enzymes in virus-infected cell cultures. *J Exp Med*; 121:463-476.
- Allison, A.C., Young, M.R. 1964b. Uptake of dyes and drugs by living cells in culture. *Life Sci*; 3:1407-1414.
- Amsterdam, A. and Selvaraj, N. 1997. Control of differentiation, transformation, and apoptosis in granulosa cells by oncogenes, oncoviruses, and tumor suppressor genes. *Endocrine reviews*; 18:435-461.
- Amsterdam, A., Dantes, A., Hosokawa, K., Schere-Levy, C.P., Kotsuji, F., Aharoni, D. 1998. Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cell. *Steroids*; 63:314-318.
- Andreani, C.L. Payne, D.W., Packman, J.N., Resnick, C.E., Hurwitz, A. and Adashi, E.Y. 1991. Cytokine-mediated regulation of ovarian function. Tumor necrosis factor alpha inhibits gonadotropin-supported ovarian androgen biosynthesis. *J Biol Chem*; 266:6761-6766.

- Ankarcrona, M., Dypbukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A. and Nicotera, P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*; 15:961-973.
- Antonsson, B. Martinou, J-C. 2000. The bcl-2 protein family. *Experim Cell Res*; 256:50-57.
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A.M., Montesuit, S., Lew, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. and Martinou, J-C. 1997. Inhibition of Bax Channel forming action by Bcl-2. *Science*; 277:370-372.
- Aplin, A., Jasianowski, T., Tuttle, D.L., Lenk, S. and Dunn, W.A. 1992. Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *J Cell Physiol*; 153:458-466.
- Arends, M.J., Morris, R.G. and Wyllie, A.H. 1990. Apoptosis: the role of the endonuclease. *Am J Pathol*; 136:593-608.
- Asem, E.K. and Hertelendy, F. 1985. Influence of follicular maturation on luteinizing hormone, cyclic 3'5'-adenosine monophosphate, forskolin- and cholesterol-stimulated progesterone production in hen granulosa cells. *Biol Reprod*; 32:257-268.
- Baehner, R.L., Karnovsky, M.J., Karnovsky, M.I. 1968. Degranulation of leukocytes in chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*; 47:187-192.
- Bagavandoss, P., Midgley, A.R.J. and Wicha, M. 1983. Developmental changes in the ovarian follicular basal lamina detected by immunofluorescence and electron microscopy. *J Histochem Cytochem*; 31:633-640.
- Baker, J; Hardy, M.P; Zhou, J; Bondy, C; Lupu, F; Bellve, A.R. and Efstratiadis, A. 1996. Effects of an IGF1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol. Endocrinol*; 10:903-918.
- Balaban, R.S. 1990. Regulation of oxidative phosphorylation in the mammalian cell. *Am J Physiol*; 258:C377.
- Balla, G., Jacob, H.S., Balla, J., Nath, K., Eaton, J.W. Vercellotti, G.M. 1993. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: Induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:9285-9289.
- Balla, J., Jacob, H.S., Balla, G., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.W., Vercellotti, G.M. 1992. Ferritin: A cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*; 267:18148-18153.
- Ballesteros, L.M., Rosales, A.M. Rosado, A. and Hernández-Pérez, O. 1992. Activity, compartmentation and subcellular distribution of lysosomal enzymes during follicular maturation in the goat. *Animal Reproduction Science*; 27:129-139.
- Ballou, L.R., Lauderkind, S.J.F., Rosloniec, E.F., Raghow, R. 1996. Ceramide signaling and the immune response. *Biochim Biophys Acta*; 1301:273-287.
- Baños, M.E., Rosales, A.M., Ballesteros, L.M., Hernandez-Perez, O. and Rosado, A. 1996. Changes in lysosomal enzyme activities in pre-ovulatory follicles and endometrium of PMSG superovulated rats. *Arch Med Res*; 27: 49-55.
- Bao, B., Calder, M.D., Xie, S., Smith, M.F. Salfen, B.E. Youngquist, R.S. and Garverick, H.A. 1998. Expression of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid is limited to theca of healthy bovine follicles collected during recruitment, Selection, and Dominance of Follicles of the first follicular wave. *Biology of Reproduction*; 59:953-959.
- Bao, B., Garverick, H.A., Smith, G.W., Smith, M.F., Salfen, B.s., Youngquist, R.S. 1997. Expression of messenger RNA encoding 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase/ isomerase

- during recruitment and selection of bovine ovarian follicles: Identification of dominant follicles by expression of 3-betas-HSD mRNA within the granulosa cell layer. *Bio. Reprod*; 56:1466-1473.
- Barclay, L.R.C. and Ingold, K.U. 1981. Autooxidation of biological molecules. 2. The autooxidation of a model membrane. A comparison of the autooxidation of egg lectin phosphatidyl choline in water and in chlorobenzene. *J Am Chem Soc*; 103:6478-6485.
- Barinaga, M. 1994. Cell suicide: by ICE, not fire. *Science*; 263:754-756.
- Barrett, A.J. and Heath, M.F. 1977. Lysosomal enzymes. In: *Lysosomes. A laboratory Hand book* (2 ed) Dingle, J.T. (ed) North Holland Publishing Company, Amsterdam, Netherlands, 19-145.
- Basanez, G., Nechustan, A., Drozhinin, o., chanturiya, A., choe, E., Tutt, S., Wood, K.A., Hsu, Y., Zimmerberg, J. and Youle, R.J. 1999. Bax, but not Bcl-xL, decreases the lifetime of planar phospholipid bilayer membranes at subnanomolar concentrations. *Proc Natl acad Sci USA*; 96:5492-5497.
- Batistatou, A., Greene, L.A. 1991. Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *J Cell Biol*; 115:461-471.
- Beaulaton, J. and Lockshin, R.A. 1977. Ultrastructural study of the normal degeneration of the intersegmental muscle of *Antheraea polyphemus* and *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera) with particular reference to cellular autophagy. *J Morphol*; 154:39-57.
- Beaumont, H.M. and Mandl, A.M. 1962. A quantitative and cytological study of oögonia and oöcyte in the foetal and neonatal rat. *Proc R. Soc. Lond (Biol)* 155:557-579.
- Bedell, M.A; Brannan, C.I; Evans, E.P; Copeland, N.g; Jenkins, N.A. and donovan, P.J. 1995. DNA rearrangements located over 100 kb 5' of the Steel (S1)-coding region in Steel-panda and Steel- constricted mice deregulate S1 expression and cause female sterility by disrupting ovarian follicle development. *Genes Dev* 9:455-470.
- Bellgrau, D., Gold, D., Selawry, H., Moore, J., Franzusoff, A. and Duke, R.C. 1995. A role ligand in preventing graft rejection. *Nature*; 377:630-632.
- Benson, R.S.P., Dive, C. and Watson, A.J.M. 1999. Cytoplasmic acidification is not an effector mechanism of VP16 or DEX-induced apoptosis in CEM T leukemia cells. *J Cell Sci*; 112:1755-1760.
- Bernardi, P. 1996. The permeability transition pore. Control points of a cyclosporin A-sensitive mitochondria channel involved in cell death. *Biochim Biophys Acta*; 1275:5-9.
- Bernardi, P. and Petronilli, V. 1996. *J Bioenerg Biomembr*; 28:129-136.
- Bernardi, P., Brockemeyer, K.M. and Pfeiffer, D.R. 1994. Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*; 26:509-517.
- Bernardi, P.J. 1992. *Biol Chem*; 267:8834.
- Berndt, C., Müpps, B., Angermüller, S., Gierschik, P. and Krammer, P. 1998. CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:12556-12561.
- Besnard, N., Pisselet, C., Monniaux, D., Locatelli, A., Benne, F., Gaser, F., Hatey, F., Monget, P. 1996. Expression of messenger ribonucleic acids of insulin-like growth factor binding protein-2, -4, and -5 in the ovine ovary: location and changes during growth and atresia of antral follicles. *Biol Reprod*; 55:1356-1367.

- Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., Welte, W., Brdiczka, D. 1996. Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate traslocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett*; 396:189-195.
- Bicsak, T.A., Shimonaka, M., Malkowski, M. and Ling, N. 1990. Insulin-like growth factor-binding protein (IGF-BP) inhibition of granulosa cell funtion: effect on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, deoxyribonucleic acid synthesis, and comparison with the effect of an IGF antibody. *Endocrinology*; 126:2184-2189.
- Billig, H., Chun, S.Y., Eisenhauer, K. and Hsueh, A.J. 1996. Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise. *Hum reprod Update*; 2:103-117.
- Billig, H., Furuta, H.I. and Hsueh, A.J. 1993. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*; 133:2204-2212.
- Billig, H., Furuta, H.I. and Hsueh, A.J. 1994. Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of beoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology*; 134:245-252.
- Bissonette, R.P., Echeverri, F., Mahboubi, A., Green, D.R. 1992. Apototic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*; 359:552-554.
- Bjersing, L. 1978. Maturation, morphology, and endocrine funtion of the follicular wall in mammals. In: Jones, R.E. de. *The vertebrate ovary*, New York: Plenum; 181-214.
- Blankson, H., Hole, I. and Seglen, P.O. 1995. Disruption of the cytokeratin cytoskeleto and inhibition of hepatic autophagy by okadaic acid. *Exp Cell Res*; 218:522-530.
- Block, E. 1951. Quantitative morphological investigation of the follicular system in women. *Acta Endorinol (copenh)* 8:33-54.
- Blomart, E.F.C., Luiken, J.J.F.P. and Meijer, A.J. 1997. Autophagic proteolysis control and specificity. *Histochem J*; 29:365-385.
- Bobcock, D.F., Herrington, J., Goodwin, P.C., Park, Y.B. and Hille, B. 1997. Mitochondrial partecipation in the intracellular Ca⁺² network. *J Cell Biol*; 136:833-844.
- Bode, H., Himmen, A. and Goke, B. 1996. Evidence of vacuolar-type proton pumps in nonmitochondrial and inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive calcium store of insulin-secreting cells. *Pflugers Arch*, 432:97-104.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nuñez, G. and Thomson, B. 1993. Bcl-x, a bcl-2-related gene that funtions a dominant regulator of apoptosis cel death. *Cell* 74:579-608.
- Boldin, M.P. Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. and Wallach, D. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death. *Cell*; 85:803-815.
- Bomsel-Helmreich, O., Gougeon, A., Thebault, A., Saltarelt, D., Milgrom, W., Frydman, R. and Papiernik, E. 1979. Healthy and atretic human follicles in the preovulatory phase: differences in evolution of follicular morphology and steroid content of follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab*; 48:686-694.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcona, M., Nicotera, P. and Lipton, S.A. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct eventts induced, respectivelely, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Nat Acad Sci USA*; 92:7162-7176.
- Bonfoco, E., Leist, M., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A. and Nicotera, P. 1996. Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J Neurochem*; 67:2484-2493.

- Boone, D.L. and Tsang, B.K. 1997. Identification and localization of DNasa I in the rat ovary. *Biol Reprod*; 57:813-821.
- Boone, D.L. and Tsang, B.K. 1998. Caspase-3 in the rat ovary localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol Reprod*; 58:1533-1539.
- Boone, D.L., Yan, W. and Tsang, B.K. 1995. Identification of a deoxyribonuclease I-like endonuclease in rat granulosa and luteal cell nuclei. *Biol Reprod*; 53:1057-1065.
- Borg, D.C. and Schaich, K.M. 1984. Cytotoxicity from coupled redox cycling of autoxidizing xenobiotics and metals. *Israel J Chem*; 24:38-53.
- Boulares, A.H., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Iyer, S. and Smulson, M. 1999. Role of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem*; 274:22932-22940.
- Boveris, A. 1977. Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. In: Revich, M., Coburn, R., Lahiri, S., Chance, B. (eds). *Tissue hypoxia and ischemia*. New York; Plenum Press; pp 67-82.
- Boveris, A. and Chance, B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J*; 134:707-716.
- Brancolini, C., Lazarevic, D., Rodriguez, J. and Schneider, C. 1997. Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase dependent proteolytic cleavage of beta-catenin. *J Cell Biol*; 139:759-771.
- Brand, A. and de Jong, W.H.R. 1973. Qualitative and quantitative micromorphological investigation of tertiary follicle population during the oestrus cycle in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*; 33:431-439
- Braw, R.H. and Tsafiri, A. 1980. Effect of PMSG on follicular atresia in the rat ovary. *J. Reprod Fert*; 59:267-272.
- Braw-Tal, R. 1994. Expression of RNAm for follistatin and inhibin/activin subunits during follicular growth and atresia. *J. Mol Endocrinol*; 13:253-264.
- Breckwoldt, M., Sclaraj, N., Aharoni, D., et al. 1996. Expression of Ad4-BP/cytochrome 450 side chain cleavage enzyme and induction of cell death in long term cultures of human granulosa cells. *Mol Hum Reprod*; 6:391-400.
- Breitenacker, G., Friedrich, F. and Kemeter P. 1978. Further investigations on the maturation and degeneration of human ovarian follicles and their oocytes; *Fertil Steril*; 29:336-341.
- Broekemeier, K.M., Klocek, C.K. and Pfeiffer, D.R. 1998. Proton selective substrate of the mitochondrial permeability transition pore: regulation by redox state of the electron transport chain. *Biochemistry*; 37:13059-13065.
- Brown, S.B., Bailey, K. and Savill, J. 1997. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem J*; 323:233-237.
- Bruce, N.W. and Moor, R.M. 1976. Capillary blood flow to ovarian follicles, stroma and corpora lutea-anaesthetized sheep. *J Reprod Fertil*; 46:299-304.
- Brunk, U.T. Ericsson, J.L.E. 1972. Cytochemical evidence for the leakage of acid phosphatase through ultrastructurally intact lysosomal membranes. *Histochemical J*; 4:479-491.
- Brunk, U.T. Jones, C.B., Sohal, R.S.A. 1992. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mut Res*; 275:395-403.

- Brunk, U.T., Dalen, H., Roberg, K. and Hellquist, H.B. 1997b. Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts. *Free Rad Biol Med*; 23:616-626.
- Brunk, U.T., Zhang, H., Roberg, K., Öllinger, K. 1995a. Exposure of cells to nonlethal concentration of hydrogen peroxide induces degeneration-repair mechanisms involving lysosomal destabilization. *Free Radic Biol Med*; 19:813-822.
- Brunk, U.T., Zhang; H., Roberg, K. and Öllinger, K. 1995b. Lethal hydrogen peroxide toxicity involves lysosomal iron-catalyzed reaction with membrane damage. *Redox Report*; 1:267-277.
- Brustovetsky, N. and Klingenberg, M. 1996. Mitochondrial ADP/ATP carrier can reversibly converted into a large channel by Ca²⁺. *Biochemistry*; 35:8483-8488.
- Buccione, R; Schroeder, A.C. and Eppig, J.J. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biol Reprod.* 43:543-547.
- Buckbinder, L., Talbott, R., Valesco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B.R. and Kley, N. 1995. Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature*; 377:646-649.
- Bukosky, A., Presl, J. and Zidovsky, J. 1979. Migration of lymphoid into the granulosa of rat ovarian follicles. *IRCS Med Sci*; 7:603-604.
- Bukovsky, A., Presl, J. and Holub. 1984. The ovarian follicles as a model for the cell mediated control of tissue of tissue growth. *Cell Tissue Res*; 236:717-724.
- Bursch, W., Hohegger, K., Török, L., Marian, B., Ellinger, A. and Hermann, R.S. 2000. Autophagia and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci*; 113:1189-1198.
- Bursch, W., Kienzl, H., Elliger, A., Török, L., Walker, R., Sikorska, M., Pandey, S. and Schulte-Hermann, R.R. 1996. Active cell death induced by antiestrogens tamoxifen and ICI 164384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis*; 17:1595-1607.
- Butt, A.J., Harvey, N.L., Parasivam, G. and kumar, S. 1998. Dimerization and autoprocessing of the Nedd2 (caspase-2) precursor requires both the prodomain and the carboxyl-terminal region. *J Biol Chem*; 273:6763-6768.
- Byskov, A.G. 1974. Cell kinetic studies of follicular atresia in the mouse ovary. *J Reprod Fertil*; 37:277-285.
- Byskov, A.G. 1978. Follicular atresia. In: Jones R.E. (de) *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution*. Plenum, New York, pp 533-562.
- Calvert, C.M. and Sanders, D. 1995. Inositol triphosphate-dependent and -independent Ca²⁺ mobilization pathway at the membrane of *Candida albicans*. *J Biol Chem*; 270:7272-7280.
- Campbell, B.K. Scaramuzzi, R.j. and Wedd, R. 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *Journal of reproduction and Fertility Supplement*; 49:335-350.
- Campbell, B.K., Dobson, H. and Scaramuzzi, R.J. 1998. Ovarian function in ewes made hypogonadal with GnRH antagonist and stimulated with FSH in the presence or absence of low amplitude LH pulses. *Journal of Endocrinology*; 156:231-222.
- Campbell, B.K., Dobson, H. and Scaramuzzi, R.J. 1999. Examination of the relative roles of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility* 117:355-367.

- Campbell, B.K; McNeilly, A.S; Mann, G.E. and Baird, D.T. 1991. The effect of stage of oestrus cycle and follicular maturation on ovarian inhibin production in sheep. *Biol of Reproduction* 44:483-490.
- Carafoli, E. 1989. Intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Annu Rev Biochem*; 56:395-433.
- Carayon, P., Portier, M., Dussossoy, D., Bord, A., Petipretre, G., Canat, X., Le Fur, G., Casellas, P. 1996. Involvement of peripheral benzodiazepine receptors in the protection of hematopoietic cells against oxygen radical damage. *Blood*;3170-3178.
- Carnegie, J.A. and Tsang, B.K. 1988 The cytoskeleton and rat granulosa cell steroidogenesis possible involvement of microtubulos and microfilaments. *Biol Reprod*; 38:100-108.
- Carson, R.S., Findlay, J.K., Burger, H.G., Trounson, A.O. 1979. gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biol Reprod*; 21:75-87.
- Carson, R.S., Findlay, J.K., Clarke, J.K. and Burger, H.F. 1981. Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol Reprod*; 24:400-420.
- Castoldi, G.L. Beutler, E. 1988. Erythrocytes. In: Zucker-Franklin D., Greaves, M.F., Grossi, C.E., Marmont, A.M. (eds) *Atlas of Blood Cells: Function and Pathology*, ed 2 edi Ermes, Milan, pp 47-156.
- Castro, L., Rodriguez, M. and Radi, R. 1994. Aconitase is readily inactivated by peroxynitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem*; 269:29409-29415.
- Cataldo, N.A., Fujimoto, v.Y. and Jaffe, R.B. 1998. Interferon-gamma and activin A promote insulin-like growth factor-binding protein-2 and -4 accumulation by human luteinizing granulosa cells, and interferon-gamma promotes their apoptosis. *Clinical endocrinology & Metabolism*; 83:179-186.
- Cataldo, N.A., Rabinovici, J., Fujimoto, V.Y. and Jaffe, R.B. 1994. Follistatin antagonized the effects of activin- A on steroidogenesis in human luteinizing granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab*; 79:272-277.
- Caulin, C., Salvesen, G.S. and Oshima, R.G. 1997. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol*; 138:1379-1394.
- Centola, G.M. 1982. Light microscopic observations of alterations in staining of the zona pellucida of porcine follicular oocytes: possible early indications of atresia. *Gamete Res*; 6:293-304.
- Cifone, M.G., De Maria, R., Roncaioli, P., Rippo, M.R., Azuma, M., Lanier, L.L., Santoni, A., Testi, R. 1994. Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med*; 180:1547-1552.
- Cifone, M.G., Roncaioli, P., De Maria, R., Camarda, G., Santoni, A., Ruberti, G., Testi, R. 1995. Multiple pathway originates at the Fas/APO-1 (CD95) receptor pathways originate of phosphatidylcholine-specific phospholipase C and acid sphingomyelinase in the propagation of the apoptotic signal. *EMBO J*; 14:5859-5868.
- Clarke, P.G.H. 1990. Developmental celldeath: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol*; 181:195-213.
- Cohen, G.H. 1997. caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*; 326:1-16.
- Cohen, L.B. and Salzberg, B.M. 1978. Optical measurement of membrane potential. *Rev physiol Biochem Pharmacol*; 83:35-88.
- Columbano, A. 1995. Cell death: current difficulties in discriminating apoptosis from necrosis in the context of pathological processes in vivo. *J Cellular Biochem*; 58:181-190.

- Cossarizza, A., Franceschi, C., Monti, D., Salvioli, S., Bellesia, E., Rivabene, R., Biondo, L., Rainaldi, G., Tinari, A. and Malorni, W. 1995. *Exp Cell Res*; 220:232.
- Costantini, P., Chernyak, B.V., Petronilli, V. and Bernardi, P. 1995. *FEBS Lett*; 362:239.
- Cotter, T.G., Lennon, S.V., Glynn, J.M. and Green, D.R. 1992. Microfilament disrupting agents prevent the formation of apoptosis bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res*; 52:997-1005.
- Crichton, R.R., Ward, R.J. 1992. 1. Structure and molecular biology of iron binding proteins and the regulation of "free" iron pools. In: *Iron and Human Disease* (edited by Lauffer, R.B.), pp 23-75. Boca Raton, Ann Arbor, London and Tokyo: CRC Press.
- Crook, T. Marston, N.J., Sara, E.A. and Vousden, K.H. 1994. Transcriptional activation by p53 correlates with suppression of growth but not transformation. *Cell*; 79:817-827.
- Cross, A.R. and James, O.T.G. 1991. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*; 1057:281-298.
- Crynes, V and Yuan, J. 1998. Proteases to die for. *Genes Dev*; 12:1551-1570.
- Currin, R.T., Gores, G.J., Thurman, R.G., Lemasters, J.J. 1991. protection by acidotic pH against anoxic cell killing in perfused rat liver: evidence for a "pH paradox". *FASEB J*; 5:207-210.
- Chabot, J.G; St. Arnaud, R; Walker, P. and pelletier, G. 1986. Distribution of epidermal growth factor receptor in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol*; 44:99-108.
- Chalmers-Redman, R.M.E., Fraser, A.D.M., Carlile, G.W., Pong, A. and Tatton, W.G. 1999. Glucose protection from MPP⁺ -Induced apoptosis depends on mitochondrial membrane potential and ATP synthase. *Biochem Biophys Res Commun*; 257:440-447.
- Chandrasekher, Y.A., Clark, C.R., Faessen, G.H. and Giudice, L.C. 1995a. Role of insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) and IGFBP-4 protease in human granulosa cell function (Abstract 102). *Proc of the 28th Annual Meet of the Soc for the Study of Reprod.*
- Chandrasekher, Y.A., Van Dessel, H.J.H.M., Fauser, B.C.J.M. and Giudice, L.C. 1995b. Estrogen- but not androgen-dominant human ovarian follicular fluid containing an insulin-like growth factor binding protein-4 protease. *J Clin Endocrinol Metab*; 80:2734-2739.
- Chazzote, B., Hackenbrock, Ch.R. 1989. Lateral diffusion as a rate-limiting step in ubiquinone-mediated mitochondrial electron transport. *J Biol Chem*; 264:4978-4985.
- Chazzote, B., Hackenbrock, Ch.R. 1991. Lateral diffusion of redox components in the mitochondrial inner membrane is unaffected by inner membrane folding and matrix density. *J Biol Chem*; 266:5873-5979.
- Chen, B.L., Smiley, S.T., 1993. Probing mitochondrial membrane potential in living cell by a J-aggregates-forming dye. In: *Manson, W.T.(ed) Fluorescent and Luminescent probes for biological activity*. London: Academic Press: pp 124-132.
- Chen, G., Cizeau, J., Vande Valde, C., Park, J.H., Bozek, G., Bolton, J., Shi, L., Dubik, D. and Greenberg, A. 1999. Nix and Nip3 form a subfamily of proapoptotic mitochondrial proteins. *J Biol Chem*; 274:7-10.
- Chen, G., Ray, R., Dubik, D., Shi, L., Cizeau, J., Bleackley, R.C. Saxena, S., Gietz, R.D. and greenberg, A.H. 1997. The E1B 19K/Bcl-2-binding protein Nip3 is a dimeric mitochondrial protein that activates apoptosis. *J Exp Med*; 186:1975-1983.
- Chen, H., Marcinkiewicz, J.L., Sancho-Tello, M., Hunt, J.S. and Terranova, P.F. 1993. Tumor necrosis factor-alpha gene expression in mouse and follicular cells. *Biol Reprod*; 48:707-714.

- Chen, Q.M., Tu, V.C., Wu, Y. and Bahl, J.J. 2000. Hydrogen peroxide dose dependent induction of cell death or hypertrophy in cardiomyocytes. *Arch Bioch Bioph*; 373:242-248.
- Chen, Z., Naito, M., Mashima, T. and Tsuruo, T. 1996. Activation of actin-cleavable interleukin 1 beta-converting enzyme (ICE) family protease CPP-32 during chemotherapeutic agent-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*; 56:5224-5229.
- Chen-Levy, Z; Nourse, J. and Cleary, M.L. 1989. The Bcl-2 candidate proto-oncogene products is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18). *Mol Cell Biol*; 9:701-710.
- Chi, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Nagashima, Y., Shirouzu, M., Fujita, H., Yoshida, M., Chen, W. Asai, A., Himeno, M., Yokoyama, S. and Kuchino, Y. 1999. Oncogenic Ras trigger cell suicide through the activation of caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene*; 18:2281-2290.
- Chien, K.R., Abrams, J., Serroni, A., Martin, J.T., Farber, J.L. 1978. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. *J Biol Chem*; 253:4809-4817.
- Chinnaiyan, A.M. Tepper, C.G., Seldin, M.F., O'Rourke, K., Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Krammer, P., Peter, M.E. and Dixit, V.M. 1996. FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem*; 271:4961-4965.
- Chio, S.S., Park, I.C., Yun, J.W., Sung, Y.C., Hong, S.I. and Shin, H.S. 1995. A novel Bcl-2 related gene, Bfl-1, is overexpressed in stomach cancer and preferentially expressed in bone marrow. *Oncogene*; 11:1693-1698.
- Chio, S.S., Park, S.H., Kim, U.J. and Shin, H.S. 1997. Bfl-1, a Bcl-2 related gene, is the human homolog of the murine A1, and maps to chromosome 15q24.3. *Mamm Genome*; 8:781-782.
- Chittenden, T., Flemington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G. and Lutz, R.J. 1995a. A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and binding function. *EMBO J*, 14:5589-5596.
- Chittenden, T., Harrington, E.A., O'Connor, R., Flemington, C., Lutz, r.J., Evan, G.I. and Guido, B.C. 1995b. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature*; 374:733-736.
- Christensen, A.K. 1975. Leyding cells, In: Greep, R.P. and Astwood, E.B. eds. *Handbook of Physiology*, Vol.V. Baltimore: Williams & Wilkins. 29:791-798.
- Chun, S.Y., McGee, E.A., Hsu, S.Y., Minami, S., LaPolt, P.S., Yao, H.H., Bahr, J.M., Gougeon, A., Schomberg, D.W. and Hsueh, A.J.W. 1999. Restricted expression of WT1 messenger ribonucleic acid in immature ovarian follicles: uniformity in mammalian and avian species and maintenance during reproductive senescence. *Bio. Reprod*; 60:365-373.
- Chun, S., Eisenhauer, K.M., Kubo, M. and Hsueh, A.J.W. 1995. Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology*; 136:3120-3127.
- Chun, S.Y. and Hsueh, A.J. 1998. Paracrine mechanisms of ovarian follicles apoptosis. *J reprod Immunol*; 39:63-75.
- Chun, S.Y., Billing, H., Tilly, J., Furuta, I., Tsafiriri, A. and Hsueh, A.J.W. 1994. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin like growth factor-1. *Endocrinology*; 135:1845-1853.

- Chun, S.Y; Eisenhauer, K.M., Kubo, M. and Hsueh, A.J.W. 1995. Interleukin-1beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. *Endocrinology*; 136:3120-3127.
- Chun, S.Y; Eisenhauer, K.M; Minami, S; Billig, H; Perlas, E. and Hsueh, A.J.W. 1996. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*; 137:1447-1456.
- Chun, S.Y; McGee, E.A; Hsu, S.Y; Minami, S; LaPolt, P.S; Yao, H.H; Bahr, J.M; Gougeon, A; Schomberg, D.W and Hsueh, A.J.W. 1999. Restricted expression of WT1 messenger ribonucleic acid in immature ovarian follicles: Uniformity in mammalian and avian species and maintenance during reproductive senescence. *Bio Reprod*; 60:365-373.
- D'Herde, K., De-Prest, B., Roels, F. 1996. Subtypes of active cell death in the granulosa of ovarian atretic follicles in the quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Reprod Nutr Dev*; 36:175-189.
- D'Sa-Eipper, C. and Chinnadurai, G. 1998. Functional dissection of Bfl-1, a Bcl-2 homolog: anti-apoptosis, oncogene cooperation and cell proliferation activities. *Oncogen*; 16:3105-3114.
- Darzynkiewicz, Z. and Kapuscinski, J. 1990. In: "Flow cytometry and sorting" Melamed, M.R. Lindmo, M.R., Lindmo, T. and Mendelsohn, M.L. (eds), 2nd ed., pp.291-314.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T. and Traganos, F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*; 27:1-20.
- Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Staiano-Coico, L., Kapusciki, J. and Melamed, M.R: 1982. Interactions of Rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res*; 42:799-806.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*; 91:231-241.
- Davies, P., Allinson, A.C. 1976. The secretion of lysosomal enzymes. In: *Lysosomes in Biology and Pathology*. J.T. Dingle and Dean, R.T.(eds). North Holland Publishing Company. Amsterdam, Netherlands, 5:61-98.
- Davies, R., Moore, A., Schedl, A., et al. 1999. Multiple roles for the Wilms' tumor suppressor, WT1. *Cancer Res*; 59:1747-1750.
- De Felici M, Dolci, S, Pesce M. 1993. Proliferation of mouse primordial germ cell in vitro: a key role for cAMP. *Dev Biol*. 157:277-280.
- Decker, R.S., Wildenthal, K. 1978. Sequential lysosomal alterations during cardiac ischemia. II. ultrastructural and cytochemical changes. *Lab Invest*; 38:662-673.
- deDuve, C. 1959. Lysosomes; a new group of cytoplasmic particles. In: *Subcellular particles* (ed by Hayashi, T.), pp 128-159. New York, The Ronalds Press Co.
- deDuve, C. 1969. The lysosomes in retrospect. In: *Lysosomes in Biology and Pathology*. J T. Dingle and H.B. Fell (eds). North holland Publishing Company. Amsterdam, Netherlands, 1:3-40.
- deDuve, C. and Wattiaux, R. 1966. Function of lysosomes. *Ann Rev Physiol*; 28:435-492.
- deDuve, C., deBarys, T., Poole., Trouet, A., Tulkens, R. and Van Hoof, F. 1974. *Biochem Pharmacol*; 23:2495-2531.
- Deiss, L.P. Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O. and Kimchi, A. 1996. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF alpha. *EMBO J*; 15:3861-3870.

- Denecker, G., Vercammen, D., Steemans, M., Van den Berghe, T., Brouckaert, G., Van Loo, G., Zhivotovsky, B., Friers, W., Grooten, J., Declerca, W. and Vandenabeele, P. 2001. Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Diff*; 8:829-840.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Saivesen, Q.R. and Reed, J.C. 1997. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*; 388:300-304.
- Dhanasakaran, N. and Moudgal, N.R. 1989. Studies on follicle atresia: role of gonadotropins and gonadal steroids in regulating cathepsin-D activity of preovulatory follicles in the rat. *Endocrinology*; 63:133-142.
- Dhanasakaran, N. and Moudgal, N.R. 1986. Studies on follicular atresia: role of tropic hormone of the immature rat. *Mol Cell Endocrinol*; 44:77-84.
- Diaz, G., Setzu, M.D., Kola, R., Diana, A. Murru, R., Sogos, V. and Gremo, F. 1999. Subcellular heterogeneity of mitochondrial membrane potential: relationship with organelle distribution and intercellular contacts in normal, hypoxic and apoptotic cells. *J Cell Sci*; 112:1077-1084.
- Dimino, M.J. 1973. The role of lysosomal enzymes in skeletal tissues. *J. Bone Joint Surg*; 55:87-95.
- Dive, C., Yoshida, T.M., Simpson, D.J. and Marrone, B.L. 1992. Flow cytometric analysis of steroidogenic organelles in differentiating granulosa cells. *Biology of Reproduction*; 47:520-527.
- Dong, J; Albertini, D.F, Nishimori, K; Kumar, T.R, Lu, N. and Matzuk, M.N. 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*; 383:531-535.
- Donovan P.J; Stott, D; Cairns, L.A; Heasman, J. and Wylie C.C. 1986. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cell behave differently in culture: *Cell*. 44:831-838.
- Doody, K.J., Lorence, M.C., Mason, J.I. and Simpson, E.R. 1990. Expression of messenger ribonucleic acid species encoding steroidogenic enzymes in human follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*; 70:1041-1045.
- Dougherty, J.J., Puri, R.K. and Toft, D.O. 1982. Phosphorylation in vivo of chicken oviduct progesterone receptor. *J. Biol Chem*; 257:14226-14235.
- Driancourt, M.A. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*; 35:55-79.
- Dubrez, L., Savoy, I., Hammon, A. and Solary, E. 1996. Pivotal role of a DEVD-sensitive step in etoposide-induced and Fas-mediated apoptotic pathways. *EMBO J*; 15:5504-5512.
- Dunn, W.A. Jr. 1990. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*; 110:1923-1933.
- Duvall, E., Wylie, A.H. 1986. Death and the cell. *Immunol Today*; 7:115-119.
- Dyrbukt, J.M., Ankarcona, M., Burkin, M., Sjöholm, A., Ström, K., Orrenius, S. and Nicotera, P. 1994. Different prooxidant level stimulated growth, trigger apoptosis or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. *J Biol Chem*; 269:30533-30560.
- Dyson, J.E.D., Simmons, D.M., Daniel, J., McLaughlin, J.M., Quirke, P. and Bird, C.C. 1996. *Cell Tissue Kinet*; 19:311-324.
- Earnshaw, W.C. 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Biol*; 7:337-343.
- Edwards R.G; Fowler R.E; Gore-Langton R.E., Gosden R.G; Jones E.C; Readhead C; Steptoe P.C. 1997. Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. *J. Reprod. Fertil* 51:237-263.

- Eguchi, T., Ewert, D.L. and Tsujimoto, Y. 1992, Isolation and characterization of the chicken bcl-2 gene: expression in a variety of tissues including lymphoid and neuronal organs in adult and embryo. *Nucleic Acid Res*; 20:4187-4192.
- Eguchi, Y., Shimizu, S. and Tsujimoto, Y. 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res*; 57:1835-1840.
- Eisenhauer, K.M., Chun, S.Y., Billig, H. and Hsueh, A.J.W. 1995. Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insulin-like growth factor binding protein. *Biol Reprod*; 53:13-20.
- El-Roeiy, A., Chen, X., Roberts, V.J. et al. 1994. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptor, and IGF-binding protein-1-6 and the location of their gene products in normal and polycystic ovarian syndrome ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*; 78:1488-1496.
- Elfont, E.A., Roszka, J.L. and Dimino, M.J. 1977. Cytochemical studies of acid phosphatase in ovarian follicles: A suggested role for lysosomes in steroidogenesis. *Biol Reprod*; 17: 787-795.
- Elmore, S.P., Qian, T., Trost, L.C., Nishimura, Y., Herman, B., Lemasters, J.J. 1997. Detection of mitochondrial depolarization during autophagy by confocal fluorescence resonance energy transfer (CFRET). *Cell Vision J Anal Morphol*; 4:170-171.
- Emoto, K., Toyamasorimachi, N., Karasuyama, H., Inoue, K. and Umeda, M. 1997. *Exp Cell Res*; 232:430-434.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. 1998. A caspase-activated Dnase that degrades DNA During apoptosis and inhibitor ICAD. *Nature*; 391:43-50.
- Entenmann, A.H., Sierralta, W., Junblut, P.W. 1980. Studies on the involvement of lysosomes in estrogen action. III. The dehydrogenation of estradiol to estrone by porcine endometrial lysosomes. *Hoppe-seyler'sZ. Physiol. Chem*; 361:959-968.
- Erickson, B.H. 1967. Radioresponse of the pre-puberal porcine ovary. *Int. Radiat. Biol.* 13:57-67.
- Erickson, G.F., Hofeditz, C., Under, M., Allen, W.R. and Dulbecco, R. 1985a. A monoclonal antibody to a mammary cell line recognizes two distinct subtypes of ovarian granulosa cells. *Endocrinology*; 117:1490-1499.
- Erickson, G.F., Magoffin, D.A., Dyer, C.A. and Hofeditz, C. 1985b. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev*; 6:71-399.
- Erickson, G.F., Nakatani, A., Ling, N., Shimasaki, S. 1992a. Localization of insulin-like growth factor-binding protein-5 messenger ribonucleic acid in rat ovaries during the estrous cycle. *Endocrinology*; 130:1867-1878.
- Erickson, G.F., Nakatani, A., Ling, N., Shimasaki, S. 1992b. Cyclic changes in insulin-like growth factor-binding protein-4 messenger ribonucleic acid in rat ovary. *Endocrinology*; 130:625-636.
- Ericsson, J.L.E. 1969. Mechanismo of cellular autophagy. In: *Lysosomes in biology and pathology* (ed. by Dingle, J.T and Fell, H.B.), Vol 2, pp. 345-387.
- Ezzel, R.M., Szego, C.M. 1979. Luteinizing hormone-accelerated redistribution of lysosome-like organelles preceding dissolution of the nuclear envelope in rat oocytes maturing in vitro. *J Cell Biol*; 82:264-277.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. and Henson, P.M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surfaced de apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*; 148:2207-2216.

- Fanidi, A., Harrington, E.A. and Evan, G.I. 1992. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature*; 359:554-556.
- Farber, E. 1994. Programmed cell death: Necrosis versus apoptosis. *Mod Pathol*; 7:605-609.
- Farber, J.L. Kyle, M.E. Coleman, J.B. 1990. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest*; 62:670-679.
- Farrar, M.A. and Schreiber, R.D. 1993. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*; 11:571-611.
- Farrow, S.N., White, J.H., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.T., Grinham, C.J., Martinou, J.C. and Brown, R. 1995. Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature*; 374:731-733.
- Fernandez, P-A., Rotello, R.J., Rangini, Z., Doupe, A., Drexler, H.C.A. and Yuan, J. 1994. Expression of a specific marker of avian programmed cell death in both apoptosis and necrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91:8641-8645.
- Ffrench-Constant, C., Hollingsworth, A., Heasman, J., Wylie, C.C. 1991. Response to fibronectin of mouse primordial germ cells before, during and after migration. *Development*; 113:1365-1373.
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W. and Vandenabeele, P. 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*; 18:7719-7730.
- Filder, P.J., Pham, H., Adashi, E.Y. Rosenfeld R.G. 1993. Insulin-like growth factors (IGFs) block FSH-induced proteolysis of IGF-binding protein-5 (BP-5) in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*; 133:415-418.
- Findlay, J.K. 1993. An update on the roles of inhibina, activina, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod*; 48:15-23.
- Firestone, R.A., Pisano, J.M., Bonney, R.J. 1979. *J. Med Chem*; 22:1130-1133.
- Fluiter, K., van der Westhuijzen, D.R. and van Berkel, T.J.C. 1998. In vivo regulation of scavenger receptor BI and the selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl ester in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J. Biol Chem*; 273:8434-8438.
- Forabosco A, Sforza C, De Pol A, Vizzotto L, Marzona L. Ferrario V.F. 1991. Morphometric study of the human neonatal ovary. *Anat. Rec* 231:201-208.
- Forman, H.J. and Boveris, A. 1982. Superoxide radical and hydrogen peroxide in mitochondria. In *Free Radicals in Biology*, Vol 5, W.A. Pryor, ed (New York: Academic Press), pp 65-90.
- Franc, N.C., Dimarcq, J.L., Lagueux, M., Hoffmann, J., Ezekowitz, R.A. 1996. Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells, *Immunity*; 4:431-443.
- Fritsche, M., Haessler, C., Bradner, G. 1993. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene*; 8:307-318.
- Gannon, D.E., Varani, J., Phan, S.H., Ward, J.H., Kaplan, J., Till, G.O., Simon, R.H. Ryan, U.S., Ward, P.A. 1987. Source of iron in neutrophil-mediated killing of endothelial cells. *Lab Invest*; 57:37-44.
- Garcia, I., Martinou, I., Tsujimoto, Y. and Martinou, J-C. 1992. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 protooncogene. *Science*; 258:302-304.
- Garcia, R., ballesteros, L.M., Hernandez-Perez, O., Rosales, A.M., Espinosa, R., Soto, H., Diaz deLeon, L. and Rosado, A. 1997. Metalloproteinase activity during growth, maturation and atresia in the ovarian follicles of the goat. *Anim Reprod Sci*; 47:211-228.

- Gardner, A.M., Xu, F., Fady, C., Jacoby, F.J., Duffey, D.C., Tu, Y., Linhtenstein, A. 1997. Apoptotic vs nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med*; 22:73-83.
- Gaytan, F., Morales, C., Bellido, C., Aguilar, E., Sánchez-C., J.E. 1998. Ovarian follicles macrophages: Is follicular atresia in the immature rat a macrophage mediated event. *Biol Reprod*; 58:52-59.
- Gelety, T.J. and Magoffin, D.A. 1997. Ontogeny of steroidogenic enzyme gene expression in ovarian theca-interstitial cells in the rat: regulation by a paracrine theca-differentiating factor prior to achieving luteinizing hormone responsiveness. *Biol Reprod* 56:938-945.
- Gerard, P., Herlant, M. 1953. Sur la persistance de phénomènes d'oo-génèse chez les lemuriens adultes. *Arch Biol*; 64:97-111.
- Gibson, L., Holmgren, S.P., Huang, D.C., Bernard, O., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sutherland, G.R., Baker, E., Adams, J.M. and Cory, S. 1996. bcl-w, a novel member of the family, promotes cell survival. *Oncogene*; 13:665-675.
- Gilligan, A., Turner, A., Vaitukaites, J.L. 1986. Divergent metabolism of human chorionic gonadotropin subunits with rat ovarian lysosomes. *Biochem Biophys Res Comm*; 134:1197-1203.
- Ginther, O.J; Kot, K. and Wiltbank, M.C. 1995. Associations between emergence of follicular waves and fluctuation in FSH concentration during the oestrus cycle in ewes. *Theriogenology* 43:689-703
- Giudice, L.C. 1992. Insulin-like growth factor and ovarian follicular development. *Endocr Rev*; 13:641-669.
- Godin Y. and Wylie C.C. 1991. TGF-beta inhibits proliferation and has chemotropic effect on mouse primordial germ cell in culture. *Development* 113:1451-1457.
- Golberg, A.L., Jonh, A.C.St. 1976. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells; part 2. *Annu Rev Biochem*, 46:747-803.
- Goldring, N.B., Durica, J.M., Lifka, J., Hedlin, L., Ratoosh, S.L., Miller, W.L., Orly, J. and Richards, J.S. 1987. Cholesterol side-chain cleavage P450 messenger ribonucleic acid: evidence for hormonal regulation in rat ovarian follicles and constitutive expression in corpora lutea. *Endocrinology*; 120:1942-1950.
- Goldstein, I.M. and Weissman, G. 1976. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cell: part 2. *Annu Rev Biochem*; 46:747-803.
- Gonzales-Halphen, 1990. El complejo bcl de la cadena respiratoria mitocondrial. *Ciencia*; 41:133-152.
- Gores, G.J., Fleishman, K.E., Dawson, T.E., Herman, B., Nieminen, L., Lemasters, J.J. 1988. Extracellular acidosis delays onset of cell death in ATP depleted hepatocytes. *Am J Physiol*; 255:C315-C322.
- Gores, G.J., Nieminen, A-L., Wray, B.E., Herman, B., Lemasters, J.J. 1989. Intracellular pH during chemical hypoxia in cultured hepatocytes. *J Clin Invest*; 83:386-396.
- Gosden, R.G. and Telfer, E. 1987. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships; *J Zool (Lond)*.
- Gottlieb, E., Haffner, R., von Rudin, T., Wagner, E.F. Oren, M. 1994. Down-regulation of wild-type p53 activity interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal. *EMBO J*; 13:1368-1374.
- Gottlieb, T.M. and Oren, M. 1998. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol*; 8:359-368.
- Gougeon, A. 1996. Regulation of ovarioan follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*; 17:121-155.

- Greenwald, G.S. 1989. Temporal and topographic changes in DNA synthesis after induced follicular atresia. *Biol Reprod*; 41:175-181.
- Greenwald, G.S. and Roy, S.K. 1994. Follicular development and its control. in *The Physiology of reproduction*. Sec.ed. Edited by Knobil, E. and Neill, J.D. Raven Press, Ltd; New York. pp 629-724.
- Greenwald, G.S. and Terranova, P.F. 1988. follicular selection and its control. In: Knobil e. Neill, J. (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 387-435.
- Greenwald, G.S., Roy, S.K. 1994. Follicular development and its control. In: Knobil, E. and Neill, J. (eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. pp 629-724.
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., Ferguson, T.A. 1995. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*; 270:1189-1192.
- Gupte, S.S., Hackenbrock, Ch.r. 1988. Multidimensional diffusion modes and collision frequency of cytochrome c with its redox partners, *J Biol Chem*; 263:5241-5247.
- Guraya, S.S. and Greenwald, G.S. 1964. A comparative histochemical study of interstitial tissue and follicular atresia in the mammalian ovary. *Anat Rec*; 149:411-434.
- Guthrie, H.D., Garrett, W.M. and Cooper, B.S. 1997. Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod*; 58:390-396.
- Guthrie, H.I., Grimes, R.W., Cooper, B.S. and Hammond, J.M. 1995. Follicular atresia in pigs: measurement and physiology. *J Anim Sci*; 73:2834-2844.
- Guthrie, H.I., Welch, G.R., Couper, B.S., Zacaria, A.D. and Johnson, L.A. 1994. Flow cytometric determination of degraded desoxyribonucleic acid in granulosa cells to identify atretic follicles during preovulatory maturation in the pig. *Biol Reprod*; 50:1303-1311.
- Hackenbrock, Ch.R., Chazzote, B., Gupte, S.S. 1986. the random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomemb*; 18:331-368.
- Haimovitz-Friedman, A., Kan, C.C., Ehleiter, D., Persaud, R.S., McLoughlin, M., Fuks, Z., Kolesnick, R.M. 1994. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med*; 180:525-535.
- Hainaut, P. 1995. The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. *Curr Opin Oncol*; 7:76-82.
- Hakuno, N., Koji, T., Yano, T., Kobayashi, N., Tsutsumi, O., Taketani, Y. and Nakane, P. 1996. Fas/APO-1/CD95 system as mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology*; 137:1938-1948.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1989. *Free radicals in biology and medicine*, Second edition (Oxford, England:Clarendon Press).
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*; 219:1-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1985. The importance of free radical and catalytic metal ions in human disease. *Mol Aspects Med*; 8:89-193.
- Hampton, M.B. and Orrenius, S. 1997. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett*; 414:552-556.
- Hampton, M.B., Vanags, D.M., Pornares, M.I. and Orrenius, S. 1996. *FEBS Lett*; 399:277-282.
- Han, J., Sabbatini, P. and White, E. 1996. Induction of apoptosis by human Nbk/Bik, a BH3-containing protein that interacts with E1B 19K. *Mol Cell Biol*; 16:5857-5864.

- Hannun, Y.A. 1996. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science*; 274:1855-1859.
- Hasegawa, Y., Miyamoto, K., Abe, Y., Nakamura, T., Sugino, H., Eto, Y., Shibai, H. and Igarashi, M. 1988. Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. *Biochem Biophys Res Commun*; 156:668-674.
- Hawkins, H.K., Ericsson, J.I.E., Biberfeld, P., Trump, B.F. 1972. Lysosome and phagosome stability in lethal cell injury: morphologic tracer studies in cell injury due to inhibition of energy metabolism, immune cytolysis, and photosensitization. *Am J Pathol*; 68:255-288.
- Hay, M.F. and Moor, R. M. 1975. Distribution of delta5-3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in the graafian follicle of the sheep. *J. Reprod Fertil*; 43:312-322.
- Hay, M.F., Cran, D.G. and Moor, R.M. 1976. Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. *Cell Tissue Res*; 169:515-529.
- Hegde, R., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. and Alnemri, E.S. 1998. Bik, a BH3-containing mouse protein that interacts with Bcl-2 and Bcl-xL, is a potent death agonist. *J Biol Chem*; 273:7783-7786.
- Heller, R.A. and Krönke, M. 1994. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Biol*; 126:5-9.
- Hellquist, H.B., Svensson, I., Brunk, U.T., 1997. Oxidant-induced apoptosis: a consequence of lethal lysosomal leak? *Redox Report*; 3:65-70.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-C. D., Wang F., Longnecker, R., Kieff, E. and Rickson, A. 1991. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cell from programmed cell death. *Cell*; 65:1107-1115.
- Hennet, T.G., Bertoni, G., Richter, C., Peterhans, E. 1993b. Expression of Bcl-2 protein enhances the survival of mouse fibrosarcoma cells in tumor necrosis factor-mediated cytotoxicity. *Cancer Res*; 53:1456-1460.
- Herceg, Z. and Wang, Z.Q. 1999. Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. *Mol Cell Biol*; 19:5124-5133.
- Hernandez, E.R., Roberts, C.T.J. LeRoith, D., Adashi, E.Y. 1989. Rat ovarian insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression is granulosa cell-selective: 5'-untranslated mRNA variant representation and hormonal regulation. *Endocrinology*; 125:572-574.
- Hieden, N. G.V., Chandel, N. S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T. and Thompson, C.B. 1997. Bcl-x L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, 91:627-637.
- Higuchi, M, Singh, S., Jaffrezou, J-P and Aggarwal, B.B. 1996. Acid sphingomyelinase-generated ceramide is needed but not sufficient for TNF-induced apoptosis and nuclear factor-kB activation. *J Immunol*; 156:297-304.
- Hill, M., White, W.E. 1933. The growth and regression of follicles in the oestrus rabbit. *J. Physiol*; 80:174-178.
- Hillier, S.G; Tetsuka, M. and Fraser, H.M. 1997. Location and developmental regulation of androgen receptor in primate ovary. *Hum Reprod*; 12:107-111.
- Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K. and Sasada, M. 1998. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med*; 187:597-600.

- Hirose, K., Longo, D.L., Oppenheim, J.J. and Matsushima, K. 1993. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs ionization radiarion. *FASEB J*; 7:361-368.
- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S.A., Dallaporta, B., Zanzami, N., Marzo, I., Geuskens, M. and Kroemer, G. 1997. The apoptosis-necrosis paradox: apoptogenic protease activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*; 25:1573-1581.
- Hirshfiel, A.N. and Midgley, A.R.J. 1978. The role of FSH in the selection of large ovarian follicles un the rat. *Biol Reprod*; 19:606-611.
- Hirshfield A.N. 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol* 124:43-101.
- Hirshfield, A.N. 1988. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biol Reprod*; 38:1181-1188.
- Hirshfield, A.N. 1989a. Granulosa cell proliferation in very small follicles of cycling rats studied by long-term continuous tritiated-thymidine infusion. *Biol Reprod* 41:309-316.
- Hirshfield, A.N. and DeSanti, A.M. 1995. Patterns of ovarian cell proliferation in rats during the embryonic period and the first three weeks postpartum. *Biol Reprod.*; 53:1208-1221.
- Hirshfiel, A.N. 1989. Rescue of atretic follicles in vitro and in vivo. *Biol Reprod*; 40:181-190.
- Hockenbery, D.M., Nuñez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D. and Korsmeyer, S.J. 1990. Bcl-2 is a inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*; 348:334-336.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M. Milliman, C.L. and Korsmeyer, S.J. 1993. Bcl-2 funtion in a antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*; 75:241-251.
- Hoffman, S. and Edelman, G.M. 1983. Kinetic of homophilic binding by embryonic and adult forms of the neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA*; 80:5762-5766.
- Holtsberg, F.W., Steiner, M.R., Keller, J.N., Mark, R.J., Mattson, M.P. and Steiner, S.M. 1998. Lysophosphatidic aid induces necrosis and apoptosis in hippocampal neurons. *J Neurochem*; 70:66-76.
- Horie, K., Takakura, K., Taii, S., Narimoto., Noda, Y., Nishikawa, S., Nakayama, H., Fujita, J. and Mori, T. 1991. The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development. *Biol Reprod*; 45:574-552.
- Hoyer, P.E. and Anderson, H. 1977. Histochemistry of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenasa in rat ovary. *Histochemistry*; 51:167-193.
- Hsu, C.J., Hammond, J.M. 1987. Gonadotropins and estradiol stimulated immunoreactive insulin-like growth factor-I production by porcine granulosa cells in vitro. *Endocrinology*; 120:198-207.
- Hsu, H., Xiong, J. and Goeddel, D.V. 1995a. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kB activation; *Cell*; 81:495-504.
- Hsu, S.Y. and Hsueh, A.J. 1998. Intracellular mechanisms of avarian cell apoptosis. *Mol Cell Endocrinol*; 145:21-25.
- Hsu, S.Y. and Hsueh, A.J.W. 2000. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: an ovarian parading. *Physiological Reviews*; 80:593-614.

- Hsu, S.Y., Lain, R.J., Nanuel, D. and Hsueh, A.J.W. 1995b. Different 5'-flanking regions of the inhibin- α gene target transgene to the gonad and adrenal in an age-dependent manner in transgenic mice. *Curr Top Pathol*; 85:165-202.
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M. and Hsueh, A.J. 1997a. Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:12401-12406.
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., Zhu, L. and Hsueh, A.J. 1997b. Interference of BAD (Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter)-induced apoptosis in mammalian cells by 14-3-3 isoforms and P11. *Mol Endocrinol*; 11:1858-1867.
- Hsu, S.Y., Lai, R.J., Finegold, M. and Hsueh, A.J.W. 1996. Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis and increased germ cell tumorigenesis. *Endocrinology*; 137:4837-4843.
- Hsu, S.Y., Lin, P. and Hsueh, A.J. 1998. BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Mol Endocrinol*; 12:1432-1440.
- Hsu, S.Y.; Kubo, M.; Chun, S.Y.; Haluska, F.G.; Housman, D.E.; and Hsueh, A.J.W. 1995a. Wilms' tumor protein WT1 as an ovarian transcription factor: decreases in expression during follicle development and repression of inhibin- α gene promoter. *Mol Endocrinol*; 9:1356-1366.
- Hsueh, A.J., Billing, H. and Tsafiriri, A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev*; 15:707-724.
- Hsueh, A.J., Eisenhauer, K., Chun, S.Y., Hsu, S.Y. and Billig, H. 1996. Gonadal cell apoptosis. *Recent Prog Horm Res*; 51:433-455.
- Hu, Y., Benedict, M.A., Ding, L. and Nuñez, G. 1999. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1 mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J*; 18:3586-3595.
- Hughes, F.M. and Gorospe, W.C. 1991. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*; 129:2415-2422.
- Hurwitz, A. and Adashi, E. 1992. Ovarian follicular atresia as a apoptotic process: a paradigm programmed cell death in endocrine tissue. *Molecular and Cell Endocrinology*; 84:C19-C23.
- Huschschla, L.I., Jeitner, T.M., Andersson, C.E., Bartier, W.A. and Tattersall, M.H. 1994. Identification of apoptotic and necrotic human leukemic cells by flow cytometry. *Exp Cell Res*, 212:161-165.
- Hutchinson, J.S.M. and Robertson, H.A. 1966. The growth of the follicle and corpus luteum in the ovary of the sheep. *Research in Veterinary Science*; 7:17-24.
- Hutchinson, L.A., Findlay, J.K., de-Vos, F.L. and Robertson, D.M. 1987. Effects of bovine inhibin, transforming growth factor beta and bovine activin-A on granulosa cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 146:1405-1412.
- Icha, F., Jouaville, L.S., Mazat, J.P. 1997. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell*; 89:1145-1153.
- Imaizumi, K., Tsuda, M., Imai, Y., Wanaka, A., Takagi, T., and Tohyama, M. 1997. Molecular cloning of a polypeptide, dp5, induced during programmed neuronal death. *J Biol Chem*; 272:18842-18848.

- Imberti, R., Nieminen, A-L., Herman, B., Lemasters, J.J., 1993. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injuries to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose cyclosporin A and trifluoperazine. *J Pharmacol Exp Ther*; 265:392-400.
- Inohara, N., Ding, L., Chen, S. and Nuñez, G. 1997. Harakiri, a novel regulator cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting protein Bcl-2 and Bcl-xL. *EMBO J*; 16:1686-1694.
- Inohara, N., Gourley, T.S., Carrio, R., Muniz, M., Merino, J., Garcia, I., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. and Nunez, G. 1998. diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death. *J Biol Chem*; 273:32479-32486.
- Isahara, K., Ohsawa, Y., Kanamori, S., Shibata, M., Waguri, S., Sato, N., Gotow, T., Watanabe, T., Momoi, T., Urase, K., Kominami, E., Uchiyama, Y. 1999. Regulation of novel pathway for cell death by lysosomal aspartic and cysteine proteinase. *Neuroscience*; 91:233-249.
- Ishisaka, R., Utsumi, T., Yabuki, M., Kanno, T., Furuno, T., Inoue, M., Utsumi, K. 1998. Activation of caspase-3 like protease by digitonin treated lysosomes. *FEBS Letters*; 435:233-236.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., Nagata, S. 1991. The polypeptide encoding the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*; 66:233-243.
- Izawa, M., Nguyen, P.H., Kim, H.H. and Yeh, J. 1998. Expression of the apoptosis-related genes, caspase-1, caspase-3, DNA fragmentation factor, and apoptotic protease activating factor-1, in human granulosa cells. *Fert Steril*; 70:549-552.
- Jacobson, M.D., Burnett, J.F., King, M.D., Miyashita, T., Reed, J.C. and Raff, M.C. 1993. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*; 361:365-369.
- Jaffrézou, J.P., Levade, T., Bettaieb, A., Andrieu, N., Bezombes, C., Macstre, N., Vermeersch, S., Rousse, A., Laurent, G. 1996. Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J*; 15:2417-2424.
- Janicke, R.U., Ng, P., Sprengart, M.L. and Porter, A.G. 1998b. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem*; 273:15540-15545.
- Jennings, R.B. and Reimer, K.A. 1981. Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol*; 102:241-255.
- Jewell, S.A., Bellomo, G., Thor, H., Orrenius, S. and Smith, M.T. 1982. Bled formation in hepatocytes during drug metabolism is caused by disturbance in thiol and calcium ion homeostasis. *Science*; 217:1257-1259.
- Jia, L., Dourmashkin, R.R., Newland, A.C. and Kelsey, S.M. 1997. Mitochondrial ultracondensation, but not swelling, is involved in TNF alpha-induced apoptosis in human T-lymphoblastic leukaemic cells. *Leuk Res*; 21:973-994.
- Jochova, J., Quaglino, D., Zakeri, Z., Woo, K., Sikorka, M., Weaver, V. and Lockshin, R.A. 1997. Protein synthesis, DNA degradation, and morphological changes during programmed cell death in labial glands of *Manduca sexta*. *Dev Genet*; 21:249-257.
- Johnson, A.L. and Tilly, J.L. 1994. Expression of bcl-x protooncogene mRNA in granulosa cells during ovarian follicle development. *Biol Reprod (Suppl 1)*; 50:93.
- Johnson, A.L., Bridgman, J.T., Witty, J.P. and Tilly, J.L. 1996. Susceptibility of avian ovarian granulosa cells to apoptosis is dependent upon stage of follicle development and related to endogenous level of bcl-x long gene expression. *Endocrinology*; 137:2059-2066.

- Johnson, A.L., Li, Z. and Tilly, J.L. 1993. Expression of c-myc and bcl-2 mRNA during ovarian follicle development. *Biol Reprod (Suppl 1)*; 48:153.
- Johnson, L.V., Walsh, M.L. and Chen, L.B. 1980. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci USA*; 77:990-994.
- Johnson, L.V., Walsh, M.L., Bokus, B.J. and Chen, L.B. 1981. Monitoring of relative mitochondrial membranes potential in living cells by fluorescence microscopy. *J Cell Biol*; 88:526-535.
- Johnson, M.S.C., Svensson, P-A., Helou, K., Billig, H., Levan, G., Carlsson, L.M.S. and Carlsson, B. 1998. Characterization and chromosomal localization of rat scavenger receptor class B type I, a High density lipoprotein receptor with a putative leucine zipper domain and peroximal targeting sequence. *Endocrinology*; 139:72-80.
- Jolly, P.D. Tisdall, D.J., Delath, G., Heath, D.A. Lun, S., Hudson, N.I. and McNatty, K.P. 1996. Granulosa cell apoptosis aromatase activity cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to gonadotropin, and follicular fluid steroid levels during spontaneous and induced follicular atresia in ewes. *Biol Reprod*; 56:830-836.
- Jolly, P.D. Tisdall, D.J., Heath, D.A., Lun S., McNatty, K.P. 1994. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone and follicular atresia. *Biol Reprod*; 51:934-944.
- Jolly, P.D., Heath, D.A. Hudson, N.L. Lun, S. Still, L.A. Watts, C.H. and McNatty, K.P. 1997. Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrana granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes. *Biology of Reproduction*; 56:837-846.
- Jones, E.C. 1956. The aging ovary. PhD Thesis, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom.
- Junqueira, L.C. Carneiro, J. and Kelly, R.O. 1989. *Basic Histology*. Appleton and Lange, Norwalk, C.T. pp. 443-444.
- Kadowaki, M., Venerando, R., Miotto, G. and Mortimore, G.E. 1996. Mechanism of autophagy in permeabilized hepatocytes: evidence for regulation by GTP binding proteins *Adv Exp Med Biol*; 389:113-119.
- Kaelin, W.G. Jr. 1999. Cancer. Many vessels, faulty gene. *Nature*; 399:203-204.
- Kaipia, A. and Hsueh, A.J.W. 1997. Regulation of ovarian follicular atresia. *Annu Rev Physiol*; 59:349-363.
- Kane, A.B., Stanton, R.P., Raymond, E.G., Dobson, M.E., Knafelc, M.E., Farber, J.L. 1980. Dissociation of intracellular lysosomal rupture from cell death caused by silica. *J Cell Biol*; 87:643-651.
- Kane, D.J. Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B. Valentine, J.S., Ord, T. and Bredesen, D.E. 1993. Bcl-2 inhibition neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science*; 262:1274-1277.
- Kapoor, M. and Lozano, G. 1998. Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:2834-2837.
- Kass, G.E., Juedes, M.J. and Orrenius, S. 1992. Cyclosporin A protects hepatocytes against prooxidant-induced cell killing. *Biochem Pharmacol*; 44:1995-2003.
- Kasson, B.G., Median, R., Davoren, J.B. and Hsueh, A.J.W. 1985. Identification of subpopulations of rat granulosa cells: sedimentation properties and hormonal responsiveness. *Endocrinology*; 117:1027-1034.

- Kastan, M.B., Ouyckwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Craig, R.W. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*; 51:6304-6311.
- Katunuma, N., Matsui, A., Kakegawa, T., Murata, E., Asao, T., Ohba, Y. 1999. Study of the function share of lysosomal cathepsin by the development of specific inhibitors. *Adv Enzyme Regul*, 39:247-260.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. and Poirier, G.G. 1993. specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*; 53:3976-3985.
- Kayalar, C., Örd, T., Testa, M.P., Zhong, I. and Bredesen, D.E. 1996. Cleavage of actin by interleukin 1beta-converting enzyme to reverse Dnase inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:2234-2238.
- Kelekar, A., Chang, B.S., Harlan, J.E., Fesik, s.W. and Thompson, B. 1997. Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-xL. *Mol Cell Biol*; 17:7040-7046.
- Keren-Tail, I., Suh, B.S., Dantes, A., Lindner, S., Oren, M. and Amsterdam, A. 1995. Involvement of p53 expression in cAMP-mediated apoptosis in immortalized granulosa cell. *Exp Cell Res*; 218:283-295.
- Kerr, J.F.R., Searle, J., Harmon, B.M. and Bishop, C.J. 1987. In: perspectives on mammalian cell death (Bowen, C.S., cd), pp:93-127 Oxford univ. Press New Yor.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.II. and Currie, A.R. 1972. Apoptosis, a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; 26:239-257.
- Keshet, E., Lyman, S.D., Willams, D.E., Anderson, D.M, Jenkins, N.A., Copeland, N.G. and Parada, L.F. 1991. embryonic RNA expression patterns of the c-kit receptor and its cognate ligando suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J*; 10:2425-2435.
- Keyer, K. and Imlay, J.A. 1996. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:13635-13640.
- Keyer, K., Strohmeyer-Gort, A. and Imlay, J.A. 1995. Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J Bacteriol*; 177:6782-6790.
- Kim, J-M., Boone, D.L., Auyeung, A. and Tsang, B.K. 1998. Granulosa cell apoptosis induced at the penultimate stage of follicular development is associated with increased levels of Fas and Fas ligand in the rat ovary. *Biol Reprod*; 58:1170-1176.
- Kim, J-M., Yoon, Y-D. and Tsang, B.K. 1999. Involvement of the Fas/fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology*; 140:2307-2317.
- Kim, J.W., Won, J., Sohn, S. and Joe, C.O. 2000. DNA-binding activity of the N-terminal cleavage product of poly(ADP-ribose)polymerase is required for UV mediated apoptosis. *J Cell Sci*; 113:955-961.
- Kimura, Y., Manabe, N., Matsushita, H., Tajima, C., Myoumoto, A. and Miyamoto, H. 1998a. examination of granulosa cell glycoconjugates which change during follicular atresia in the pig ovary. *J Reprod Dev*; 44:35-44.
- Kimura, Y., Manabe, N., Nishihara, S., Matsushita, H., Tajima, C., Wada, S. and Miyamoto, H. 1999. Up-regulation of the alfa2,6-sialyltransferase messenger ribonucleic acid increases glycoconjugates containing alfa2,6-linked sialic acid residues in granulosa cells during follicular atresia of porcine ovaries. *Biology of Reproduction*; 60:1475-1482.

- Kimura, Y., Manabe, N., Matsushita, H., Imai, Y., Sugimoto, M. and Miyamoto, H. 1998b. Granulosa cell glycoconjugates found in atretic follicles of the pig ovary. In: Miyamoto, H. and Manabe, N. (eds), *Reproductive Biology Update: Novel tool for assessment of environmental toxicity*. Kyoto: Nakanishi Publ. Co; 59-66
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J*; 14:5579-5588.
- Kitanaka, C. and Kuchino, Y. 1999. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Diff*; 6:508-515.
- Klingenberg, M. 1980. *J Membr Biol*; 56:8834.
- Knecht, M., Dardon, J.M., Ranta, T., Baukal, A.J., Catt, K.J. 1984. Estrogens enhance the adenosine 3', 5'-monophosphate-mediated induction of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptors in rat granulosa cells. *Endocrinology*; 115:41-49.
- Knudson, C.M., Tung, K.S.K., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A.J. and Korsmeyer, S.J. 1995. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*; 270:96-99.
- Ko, J.L. and Prives, C. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*; 10:1054-1072.
- Kolesnick, R.N. 1991. Sphingomyelin and derivatives as cellular signals. *Prog Lipid Res*; 30:1-38.
- Kolesnick, R.N., Krönke, M. 1998. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol*; 60:643-665.
- Kondo, H., Maruo, T., Peng, X. and Mochizuki, M. 1996. Immunological evidence for the expression of the Fas antigen in the infant and adult human ovary during follicular regression and atresia. *J Clin Endocrinol Metab*; 81:2702-2710.
- Koseki, T., Yamato, K., Krajewski, S., Reed, J.C., Tsujimoto, Y. and Nishihara, T. 1995. Activin A induced apoptosis is suppressed by Bcl-2. *FEBS Lett*; 376:247-250.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, J. and Williams, L.T. 1997. Caspase 3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological changes in apoptosis. *Science*, 278:294-298.
- Kotsuji, F. and Tominaga, T. 1994. The role of granulosa and theca cell interactions in ovarian structure and function. *Microsc Res Tech*; 27:97-107.
- Kovacs, J., Forgo, V., Peczely, P. 1992. The fine structure of the follicular cells in growth and atretic ovarian follicles of the domestic goose. *Cell Tissue Res*; 267:561-569.
- Kozarsky, K.F., Donahue, M.H., Rigotti, A., Iqbal, S.N., Edelman, E.R. and Krieger, M. 1997. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*; 387:414-417.
- Krebs, J.J.R., Hauser, H., Carafoli, E. 1979. Asymmetric distribution of phospholipids in the inner membrane of beef heart mitochondria. *J Biol Chem*; 254:5308-5316.
- Krieger, M. 1997. The other side of scavenger receptor: pattern recognition for host defense. *Curr Opin Lipidol*; 8:275-280.
- Kroemer, G., Dallaporta, B. and Resch-Rigon, M. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*; 60:619-642.
- Kroemer, G., Petit, P., Zanzami, N., Vayssière, J-L. and Mignotte, B. 1995. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J*; 9:1277-1287.

- Kroemer, G., Zanzami, N. and Susin, S.A. 1997. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*; 18:44-51.
- Krönke, M., Schütze, S., Wiegmann, K. and Machleidt, T. 1996. Spingomyelinases and TNF-induced apoptosis. *Cell Physiol Biochem*; 6:337-344.
- Kruidering, M., van de Water, B., Zhan, Y., Baede, J.J., deHeer, E., Mulder, G.J., Stevens, J.L. and Nagelkerke, F. 1998. Cisplatin effects on F-actin and matrix proteins precede renal tubular cell detachment and apoptosis in vitro. *Cell Death Diff*; 5:601-614.
- Ku, N.O., Liao, J. and Omary, M.B. 1997. Apoptosis generates stable fragments of human type 1 keratins. *J Biol Chem*; 272:33197-33203.
- Kudla, G., Montessuit, S., Eskes, R., Berrier, C., Martinou, J.C. Ghazi, A. and Antonsson, B. 2000. The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase-8cleaved Bid is inhibited by the N-terminal fragment. *J Biol Chem*; 275:22713-22718.
- Kudlow, J.E., Kobrin, M.S., Purchio, A.F., Twardzik, D.R., Hernandez, E.R., Asa, S.L. and Adashi, E.Y. 1987. Ovarian transforming growth factor- α gene expression: immunohistochemical localization to the theca-interstitial cell. *Endocrinology*; 121:1577-1579.
- Kugu, K., Ratts, V.S., Piquette, G.N et al, 1998. Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. *Cell Death Differ*; 5:67-76.
- Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S.S. and Flavell, R.A. 1995. Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 β converting enzyme. *Science*; 267:2000-2002.
- Kulik, G. and Weber, M.J. 1998. Akt-dependent and -independent survival signaling pathways utilized by insulin-like growth factor I. *Mol Cell Biol*; 18:6711-6718.
- Kull, F.C. and Cuatrecasas, P. 1981. Possible requirement of internalization in the mechanism of in vitro cytotoxicity in tumor necrosis serum. *Cancer Res*; 41:4885-4890.
- Kumar, S. and Colussi, P.A. 1999. Prodomains-adaptors-oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem Sci*; 24:1-4.
- Kumar, S. and Lavin, M.F. 1996. The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death. *Cell Death Differ*; 3:255-267.
- Kumar, T.R., Wang, Y., Lu, N. and Matzuk, M.M. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*; 15:201-249.
- Landschulz, K.L., Pathak, R.K., Rigotti, A., Krieger, M. and Hobbs, H.H. 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J Clin Invest*; 98:9984-995.
- Laszlo, V. and Csaba, S. 2001. Purines inhibit poly(ADP-ribose) polymerase activation and modulate oxidant-induced cell death. *The FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*; 15:99-107.
- Lavranos, T.C., Rodgerds, H.F., Bertinello, I. and Rodger, R.J. 1994. Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells; the effects of basic fibroblast growth factor and dibutyl cAMP on cell division and differentiation. *Exp Cell Res*; 211:245-251.
- Lazebnik, Y.-A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirer, G.G. and Larnshaw, W.C. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*; 371:346-347.
- Lee, K.K., Tang, M.K., Yew, D.T., Chow, P.H., Yee, S.P., Schneider, C. and Brancolini, C. 1999. gas2 is a multifunctional gene involved in the regulation of apoptosis and chondrogenesis in the developing mouse limb. *Dev Biol*; 207:14-25.

- Lee, N, MacDonald, H., Reinhard, C., Halenbeck, R., Roulston, A., Shi, T. and Williamn, L.T. 1997. Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:13642-13647.
- Lee, S.Y., Lee, Sy. Choe, Y. 1997. Traf-interacting protein (TRIP): a novel component of the tumor necrosis factor receptor (TNFR)-and CD30-TRAF signaling complexes that inhibits TRAF2-mediated NF- α B activation. *J Exp. Med*; 185:1275-1285.
- Leibovitz, D., Koch, Y., Fridkin, M., Pitzer, F., Zwickl, P., Dantes, A. Baumeister, W. and Amsterdam, A. 1995. Archaeobacterial and eukaryotic proteasomes prefer different sites in cleaving gonadotropin releasing hormone (GnRH). *J Biol Chem*; 270:11029-11032.
- Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S. and Nicotera, P. 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a swith in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med*; 185:1481-1486.
- Lemaire, C., Andréau, K., Souvannavong, V. and Adam, A. 1998. Inhibition of caspase activity induces a switc from apoptosis to necrosis. *FEBS Lett*; 425:266-270.
- Lemasters, J.J., Nieminen, A-L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A. and Herman, B. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Bioch Bioph Acta*; 1366:177-196.
- Lco, C.P., Hsu, S.Y., Chun, S.Y. Bae, H.W. and Hsueh, A.J. 1999. Characterization of the antiapoptotic Bcl-2 family member myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) and the stimulation of its message by gonadotropins in the rat ovary. *Endocrinology*; 140:5469-5477.
- Leprat, P., Ratinaud, M.H., Maftah, A., Petit, J.M. and Julien, R. 1990. Use of nonyl acridine orange and rhodamine 123 to follow biosynthesis and functional assembly of mitochondrial membrane during L1210 cell cycle. *Experim Cell Res*; 186:130-137.
- Leung, P:C.K. and Steel, G.L. 1992. Intracellular signaling in the gonads. *Endocr Rev*; 13:476-4998.
- Levade, T., Jaffrézou, J.P. 1999. Signallintg sphingomyelinases: with, where, how and why? *Biochim Biophys Acta*; 1438:1-17.
- Levec, M.G., Dabrowska, M.I., Lelli, J.L. Jr and Hinshaw, D.B. 1996. Actin polymerization and depolymerization during apoptosis in HL-60 cells. *Am J Physiol*; 271:1981-1992.
- Levine, A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*; 88:323-331-
- Levy, M.J; Hernandez, E.R; Adashi, E.Y; Stillman, R.J; Roberts Jr, C.T; and LeRoith, D. 1992. Expression of the insulin-like growth factor (IGF)-1 and 11 and the IGF-1 and 11 receptor genes during postnatal development of the rat ovary. *Endocrinology*; 131:1202-1206.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. and Yuan, J. 1998a. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*; 94:491-501.
- Li, W., Yuan, X-M., Nordgren, G., Dalen, H., Dubowchik, G.M. Firestone, R.A. and Brunk, U.T. 2000. Induction of cell death by lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Lett*; 470:35-39.
- Li, X., Peggel, H. and Menon, K.M. 1998c. In situ hybridization of high density lipoprotein (scavenger, type I) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) during folliculogenesis and luteinization: evidence for mRNA expression ind induction by human chorionic gonadotropin specifically in cell types that use cholesterol for steroidogenesis. *Endocrinology*; 139:3043-3049.

- Li, Y.Z., Li, c.J., pinto, A.V., Pardee, A.B. 1999. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced Lapachone in human carcinoma cells. *Molecular Medicine, Cambridge ma then New York*; 5:232-239.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. 1997b. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptosis protease cascade. *Cell*; 91:479-489.
- Lieberman, S., greenfield, N.J. and wolfson, A. 1984. A Heuristic proposal for understanding steroidogenic process. *Endocr Rev*; 5:128-148.
- Limura, Y., Nishiura, T., Hellerbrand, C., Behms, K.E., Schoonhoven, R., Grisham, J.W., Brenner, D.A. 1998. NFkB prevents apoptosis and liver failure during liver regeneration. *J Clin Invest*; 15:802-811.
- Lin, E.Y., Orlofsky, A., Wang, H.G., Reed, J.C. and Prystowsky, M.B. 1996. A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood*; 87:983-992.
- Liochev, S.I. 1996. The role of iron-sulfur clusters in vivo hydroxyl radical production. *Free Radic Res*; 25:369-384.
- Liochev, S.I. and Fridovich, I. 1994. The role of O₂⁻ in the production of HO: in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med*; 16:29-33.
- Liochev, S.I. and Fridovich, I. 1997. How does superoxide dismutase protect against tumor necrosis factor: a hypothesis informed by effect of superoxide on "free" iron. *Free Rad Biol Med*; 23:668-671.
- Liu, W., Kato, M., Akhand, A.A., Hayakawa, A., Suzuki, H., Miyata, T., Kurokawa, K., Hotta, Y., Ishikawa, N. and Nakashima, I. 2000. 4-hydroxynonenal induced a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death. *J Cell Sci*; 113:635-641.
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T. and Wang, X. 1998. the 40 kDa subunit of DNA fragmentation factor induced DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:8461-8466.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. 1997. DFF a heterodimeric protein that funtions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*; 89:175-184.
- Liu, X.J., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*; 86:147-157.
- Lobb, D.K., Kobrin, M.S., Kudlow, J.E. and Dorrington, J.H. 1989. Transforming growth factor-alpha in the adult bovine ovary; identification in growth ovarian follicles. *Biol Reprod*; 40:1087-1093.
- Lobel, B.L., Rosenbaum, R.M. and Deane, H.W. 1961. Enzymic correlates of physiological regression of follicles and corpora lutea in ovaries of normal rats. *Endocrinology*; 68:232-247.
- Loeffler, M. and Kroemer, G. 2000. The mitochondrial in cell death control: certainties and incognita. *Exper Cell Res*; 256:19-26.
- Long, X., Boluyt, M.O., Hipolito, M.L., Lundberg, M.S., Zheng, J.S., O'Neill, L., Cirielli, C., Lakatta, E.G. and Crow, M.T. 1997. p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest*; 99:2635-2643.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A. and Jacks, T. 1993. p53 is required for radiation induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*; 362:847-849.

- Lu, E., Wolfe, J. 2001. Lysosomal enzymes in the macronucleos of Tetrahymena during its apoptosis-like degradation. *Cell Death Differ*; 8:289-297.
- Luiken, J.J.F.P., Aerts, J.M.F.G. and Meijer, A.J. 1996. The role of intralysosomal pH in the of autophagic proteolytic flux in rat hepatocytes. *Eur J Biochem*; 235:564-573.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. 1998. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*; 94:481-490.
- MacFarlane, M., Merrison, W., Dinsdale, D. and Cohen, G.M. 2000. Active caspases and cleaved cytokeratins are sequestered into cytoplasmic inclusion in TRAIL-induced apoptosis. *J Cell Biol*; 148:1239-1254.
- Magnusson, C., Bar, A.S., Braw, R. and Tsafiriri, A. 1983. Oxygen consumption by rat oocytes and cumulus cells during induced atresia. *J Reprod Fertil*; 68:97-103.
- Magoffin, D.A; Kurtz, K.M: and Erickson, G.F. 1990. Insulin-like growth factor-1 selectively stimulates cholesterol side-chain cleave expression in ovarian theca-interstitial cells . *Mol Endocrinol*; 4:489-496.
- Maheswaran, S., Park, S., Bernard, A., Morris, J.F., Rauscher III, F.J., Hill, D.E. and Haber, D.A. 1993. Physical and functional interaction between Wt-1 and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 90:5100-5104.
- Majima, E., Shinohara, Y., Yamaguchi, N., Hong, Y.M. and Terada, H. 1994. *Biochemistry*; 33:9530.
- Majno, G. and Joris, I. 1995. Apoptosis, oncosis, and necrosis: an overview of cell death. *Am J pathol*; 146:3-15.
- Makrigiannakis, A., Amin, K., Coukos, G., Tilly, J.L. and Coutifaris, C. 2000. Regulation expression and potential roles of p53 and Wilms' tumor suppressor gene (WT1) during follicular development in the human ovary. *Clinical endocrinology & Metabolism*; 85:449-459.
- Makrigiannakis, A., Coukos, G., Christophidou-Solomidou, M., et al. 1999. N-cadherin-mediated human granulosa cell adhesion prevents apoptosis. A role in follicular atresia and luteolysis?. *Am J Pathol*; 154:1391-1406.
- Manabe, N., Imai, Y., Myoumoto, A., Kimura, Y., Sugimoto, M., Okamura, Y., Fukumoto, M., Sakamaki, K. and Miyamoto. 1997. Apoptosis occurs in granulosa cells but not cumulos cells in the atretic Graafian follicles in multiparous pig ovaries. *Acta Histochem Cytochem*; 30:85-92.
- Manabe, N., Kimura, Y., Myoumoto, A., Matsushita, H., Tajima, C., Sugimoto, M. and Miyamoto, H. 1998. Role of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. In: Yamada, T. and Hashimoyto, Y. (eds). *Apoptosis: Its role and mechanism*. Tokyo: Academic Societies Press; 97-111.
- Mandl, G.E. and Zuckerman S. 1950. The number of normal and atretic ova in the mature rat. *J. Endocrinol*; 6:426-435.
- Manikkam, M. and Rajamahendra, R. 1997. Progesterone-induced atresia of the proestrous dominant follicle in the bovine ovary: changes in diameter, insulin-like growth factor system, aromatasa activity, steroid hormones, and apoptotic index. *Biol Reprod*; 57:580-587.
- Marchetti, P., Decaudin, D., Macho, A. Zanzami, N., Hirsch, T., Susin, S. and Kroemer, G. 1997. Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial funtion, *Eur J Immunol*; 27:289-296.

- Mariana, J.C., Monniaux, D., Driancourt, M.A. and Mauleon, P. 1991. Folliculogenesis. In: Cupps, P.T (ed.). *Reproduction in Domestic Animal*, 4th ed. San Diego, C.A. Academic Press; 119-171.
- Marrone, B.L. Crissman, H.A. 1988. Characterization of granulosa cell subpopulations from avian preovulatory follicles by multiparameter flow cytometry. *Endocrinology*; 122:651-658.
- Martin, D.A., Siegel, R.M., Zheng, L. and Lenardo, M.J. 1998. Membrane oligomerization and cleavage the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Cell Chem*; 273:4345-4349.
- Martin, S.J. and Green, D.R. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cut? *Cell*; 82:349-356.
- Martin, S.J., Finnane, D.M. Amarantemenders, G.A. and Green, D.R. 1996. *J Biol Chem*; 271:28735-28756.
- Martin, S.J., O'Brien, G.A., Nishioka, W.K., McGahon, A.J., Mahboubi, A., Saido, T.C. and Green, D.R. 1995. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. *J Biol Chem*; 270:6425-6428.
- Marzo, I., Brenner, C., Zanzami, N., Jürgensmeiner, J., Susin, S.A., Vieira, H.L.A., Prévost, M-C., Xie, Z., Mutsiyama, S., Reed, J.C. and Kroemer, G. 1998. Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*; 281:2027-2031.
- Mason, H.D., Willis, D., Holly, J.M.P., Cwyfan-Hughes, S.C. Seppälä, M. and Franks, S., 1992. Inhibitory effects of insulin-like growth factor-binding proteins on steroidogenesis by human granulosa cells in culture. *Mol Cell Endocrinol*; 89:R1-R4.
- Matsui, Y., Torsoz, D., Nishikawa, S., Nishikawa, S.I., Williams, D., Zsedo, K., Hogan, B.L.M. 1992. Effect of Steel factor and leukemia inhibitory factor and murine primordial germ cells in culture. *Nature*; 353:760-752.
- Matsushima, M., Fujiwara, M.T., Takahashi, E., Minaguchi, T., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., Suzumori, K. and Nakamura, Y. 1998. Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chromosomes Cancer*; 21:230-235.
- Matzuk, M., Finegold, M.J., Su, J.J. Hsueh, A.J.W. and Bradley, A. 1992. Alfa-inhibina is a tumor-suppressor gene with gonadal specificity in mice. *Nature*; 360:313-319.
- Mauleon; P. 1967. Cinétique del'ovogenése chez les mammiferes. *Arch. Anat. Microsc Morphol Exp.* 56:125-150.
- Maxson, W.S., Hancy A.F. and Schomberg, D.W. 1985. Steroidogenesis in porcine atretic follicles: loss of aromatasa activity in isolated granulosa and theca. *Biol Reprod*; 33:495-501.
- May, J.V., Buck, P.A. and Schomberg, D.W. 1987. Epidermal growth factor enhance (¹²⁵I)iodo-follicle-stimulating hormone binding by cultured porcine granulosa cell. *Endocrinology*;120:2413-2420.
- Mayerhofer, A; Dissen, G.A; Costa, M.E. and Ojeda, S.R. 1997. A role for neorutrasmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 138:3320-3329.
- McCord, J.M.A. and Day, E.D. 1978. Superoxide-dependent production of hidroxyl radical catalysed by an iron-EDTA complex. *FEBS Lett*; 86:139-142.

- McInery, M.W., Snowman, A.M., Trifiletti, R.R. and Snyder, S.H. 1992. Proc Natl Acad Sci USA; 89:3170-3174.
- McGee, E.A. and Hsueh, A.J.W. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocrine Reviews; 21:200-214.
- McGee, E.A., Hsu, S.Y., Kaipia, A. and Hsueh, A.J. 1998. Cell death and survival during ovarian follicle development. Mol Cell Endocrinol; 140:15-18.
- McLroy, D., Sakahira, H., Talanian, R.V. and Nagata, S. 1999. Involvement of caspase -3 activated Dnase in internucleosomal DNA cleavages induced by diverse apoptotic stimuli. Oncogene; 18:4401-4408.
- McLroy, D., Tanaka, M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Nagata, S. 2000. An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. genes Dev; 14:549-558.
- McLroy, P.J., Richert, N.D. and Ryan, R.J. 1980. Biochem J; 188, 423-435.
- McNatty, K.P., Smith, D.M., Makris, A., Osathanondh, R. and Ryan, K.J. 1979. The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the status of the oocyte in vivo and in vitro. J Clin Endocrinol Metab; 49:851-860.
- McNatty, K.P., Smith, P., Hudson, N.L., Heath, D.A., Lun, S. and OW-S. 1992. Follicular development and steroidogenesis. In: Sjoberg N.O., Hamberger, L., Jansen, P.O., Owman, C. and Coelingh, H.I.J. (eds) Local regulation of Ovarian Function. Pathenon Press, Carnforth; p.p. 21-28.
- McNeilly, A.S.; Jonassen, J.A. and Fraser, H.M. 1986. Suppression of follicular development after chronic LHRH immunoneutralization in the ewe. J Reprod. Fert; 76:481-490.
- Meier, P., Silke, J., Leervers, S.J. and Evan, G.I. 2000. The Drosophila caspase DRONC is regulated by DIAP1. EMBO(Eur Mol Biol Organ) J; 19:598-611.
- Merchant, H. 1975. Rat gonadal and ovarian organogenesis with and without germ cells: an ultrastructural study. Dev Biol; 44:1-21.
- Merchant-Larios, H. and Centeno, B. 1981. Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^v mouse. In: Eleventh International Congress of Anatomy: Advances in the morphology of cell and tissues. New York: Liss 383-392.
- Merrill, A.H.Jr., Jones, D.D., 1990. An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin metabolism. Biochem Biophys Acta; 1044:1-12.
- Mestwerdt, W. 1977. Die follicel-granulosazellen in beziehung zur steroid-biosynthese in der periovulationsphase. Fortschr. Med; 95:361-365.
- Metkar, S.S., Anand, M., Manna, P.P., Naresh, K.N. and Nadkarni, J.J. 2000. Ceramide-induced apoptosis in Fas-resistant hodgkin's disease cell lines is caspase independent. Exp Cell Res; 255:18-29.
- Meunier, H., Cajander, S.B. Roberts, V.J. Rivier, C., Sawchenko, P.E., Hsueh, A.J.W. and Vale, W. 1988. Rapid changes in the expression of inhibin alpha, betaA, and betaB-subunits in ovarian cell types during the rat estrous cycle. Mol Endocrinol; 2:1352-1363.
- Michel, U., McMaster, J.W. and Findlay, J.K. 1992. Regulation of steady-state follistatin mRNA levels in rat granulosa cells in vitro. J Mol Endocrinol; 9:147-156.
- Midley Jr, A.R. 1972. Gonadotropin binding to frozen sections of ovarian tissue. In Saxena, B.B., Beling, C.G. and Gandy, H.M. eds, Gonadotropins, Wiley-Interscience, New York; 248-260.
- Miller, W.L. 1988. Molecular biology of steroid hormone biosynthesis. Endocr Rev; 9:295-318.

- Mills, J.C., Stone, N.L. and Pittman, R.N. 1999. Extranuclear apoptosis: the role of the cytoplasm in the execution phase. *J Cell Biol*; 146:703-707.
- Miro, F. and Hillier, S.G. 1996. Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin. *Endocrinology*; 137:464-468.
- Miro, F., Smyth, C.D. and Hillier, S.G. 1991. development-related effects of recombinant activin on steroid synthesis in rat granulosa cells. *Endocrinology*; 129:3388-3394.
- Miro, F., Smyth, C.D., Whitelaw, P.F., ;ilne, M. and Hillier, S.G. 1995. Regulation of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenasa5/4-isomerasa and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 by activin in rat granulosa cell. *Endocrinology*; 136:3247-3252.
- Mitchell P.A nd Burghardt R.C. 1986. The ontogeny of nexuses (gap junction) in the ovary of the fetal mouse. *Anat. Rec.* 214:283-288.
- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*; 191:144.
- Mizunuma, H., Liu, X., Andoh, K., Abe, Y., Kobayashi, J., Yamada, K., Yokota, H., Ibuki, Y. and Hasegawa, Y. 1999. Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting state. *Endocrinology*; 140:37-42.
- Mizutani, T., Sonoda, Y., Minegishi, T., Wakabayashi, K. and Miyamoto, K. 1997. Cloning, characterization, and cellular distribution of rat scavenger receptor class B type I (SRBI) in the ovary. *Biochem Biophys Res Commun*; 234:499-505.
- Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A.S., Dyer, M.J.S. Mason, D.Y. and Gredves, M.F. 1992. Ultrastructural localization of Bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem*; 40:1819-1825.
- Monget, P., Monniaux, D., Durand, P. 1989. Localization, characterization, and quantification of insulin-like growth factor-I-Binding sites in the ewe ovary. *Endocrinology*; 125:2486-2493.
- Monget, P., Pisselet, C., Monniaux, D. 1998. Expression of insulin-like growth factor binding protein-5 by ovine granulosa cells is regulated by cell density and programmed cell death in vitro. *J Cell Physiol*; 177:13-25.
- Moor, R.M., Mary, F.H., Dott, H.M. and Cran, D.J. 1978. Macroscopic identification and steroidogenic function of atretic follicles in sheep. *J Endocrinol*; 77:309-318.
- Morales, T.I., Woessner, J.F.Jr., Marsh, J.M., LeMaire, W.J. 1983. Collagen, collagenase and collagenolytic activity in rat Graafin follicles during follicular growth and ovulation. *Biochem Biophys Acta*; 759:119-122.
- Mori, t., Fujita, Y., Nihnobu, K., Ezaki, Y., Kubo, K. and Nishimura, T. 1982. Steroidogenesis in vitro by human ovarian follicles during the process of atresia. *Clin Endocrinol*; 16:391-400.
- Mortimore, G.E., Miotto, G., Venerando, R., Kadowaki, M. 1996. Autophagy. In: *Subcellular biochemistry, Vol 27, Biology of the lysosome* (ed by Lloyd, J.B. and Mason, R.W.), pp. 93-135.
- Motta, P.M. and Familiari, G. 1981. Occurrence of contractile tissue in the theca externa of atretic follicles in the mouse ovary. *Acta Anat*; 109:103-114.
- Muller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E.M., Walczak, H., Hofmann, W.J., Stremmel, W., Krammer, P.H. and Galle, P.R. 1997. Drug-induced apoptosis in hepatoma cell is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest*; 99:403-413.
- Muraio, K., Terpstra, V., Green, S.R., Kondratenko, N., Steinberg, D. and Quehenbverger, O. 1997. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI,

as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem*; 272:17551-17557.

-Murdoch, W.J. 1992. Comparative morphometry and steroidogenic function of antral ovine follicles destined for ovulation or atresia. *Domestic Animal Endocrinol*; 9:219-224.

-Murdoch, W.J. 1995. Programmed cell death in preovulatory ovine follicles. *Biol reprod*; 53:8-12

-Murray, A.A; Gosden, R.G; Allison, V. and spears, N. 1998. effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. *J. Reprod Fertil.* 113:27-33.

-Muzio, M., Chinnaiyan, A.M., Kischkei, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., et al, 1996. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signalling complex. *Cell*; 85:817-827.

-Myoumoto, A., Manabe, N., Imai, Y., Kimura, Y., Sugimoto, M., Okamura, Y., Fukumoto, M., Sakamaki, K., Yonehara, S., Niwano, Y. and Miyamoto, H. 1997. Monoclonal antibodies against pig ovarian follicular granulosa cells induce apoptotic cell death granulosa cells. *J Vet Med Sci*; 59:641-649.

-Nadler, S., Goldscher, S. 1970. The intracellular release of lysosomal contents in macrophages that have ingested silica. *J Histochem Cytochem*; 18:368-371.

-Nagata, S. 2000. Apototic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*; 256:12-18.

-Nagata, S. and Golstein, P. 1995. The Fas death factor. *Science*; 267:1449-1456.

-Nahum, R; Beyth, Y; Chun, S.Y; Hsueh, A.J.W. and Tsafiriri, A. 1996. Early onset of deoxyribonucleic acid fragmentation during atresia of preovulatory ovarian follicles in rats. *Biol Reprod* 55:1075-1080.

-Naito, M., Nagashima, K., Mashima, T. and Tsuruo, T. 1997. *Blood*; 89:2060-2066.

-Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., shibai, H., Titani, K. and Sugino H. 1992. Activin-binding protien from rat ovary is follistatin. *Science*; 247:836-838.

-Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. 1998. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *proc Natl Acad Sci USA*; 95:14681-14686.

-Neuper, W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem*; 66:863-917.

-Neuzil, J., Svensson, I., Weber, T., Weber, t., Weber, C., Brunk, U.T. 1999. alpha-tocopheryl succinate-induced apoptosis in Jurka T cells involves caspase-3 activation, and both lysosomal and mitochondrial destabilisation. *FEBS Letters*; 445:295-300.

-Nicotera, P. and Leist, M. 1997. Energy supply and the shape of death in neurons and lymphoid cells. *Cell Death Diff*; 4:435-442.

-Nicholson, D.W., Ambereen, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., Munday, N.A., Raju, S.M., Smulson, M.E., Yamin, T-T., Yu, V.L. and Miller, D.K. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*;376:37-43.

-Nieminen, A-L., Saylor, A.K., Tesfai, S.A., herman, B., Lemasters, J.J. 1995. contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injurey after exposure to t-butykhydroperoxide. *Biochem J*; 307:99-106.

-Nishihara, T., Okahshi, N. and Ueda, N. 1993. Activin A induce apoptotic cell death. *Biochem Biophys res Commun*; 197:985-991.

-Noel, B; Bister, J.L nad Paquay, R. 1993. Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *Journal of Reproduction and Fertility.* 99:695-700.

- Nunez, G., and Clarke, M.F. 1994. The Bcl-2 family of proteins: regulation of cell death and survival. *Trends Cell Biol*; 4:399-403.
- Nunez, G., London, L., Hockenbery, D., Alexander, M., McKeam, J.P. and Korsmeyer, S.J. 1990. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol*; 144:3602-3610.
- O'Connell, M., Halliwell, B., Moorhouse, C.P. Aruoma, O.I., Baum, H., Peters, T.J., 1986. Formation of hydroxyl radicals in the presence of ferritin and haemosiderin. *Biochem J*; 234:727-731.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S. and Huang, D.C. 1998. Bim, a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J*; 17:384-395.
- O'Shea, I.D., Hay, M.F. and Cran, D.G. 1978. Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *J.Reprod Fertl*; 54:183-187.
- Obeid, L.M., Linaudic, C.M., Karolak, L.A., Hannun, Y.A. 1993. Programmed cell death induced by ceramide. *Science*; 259:1769-1771.
- Ogihara, K., Zubkov, A.Y., Parent, A.D., Zhang, J.H. 2000. Oxyhemoglobin produces necrosis in cultured smooth muscle cells. *Acta Neurochir Suppl*; 76:507-510.
- Ohkuma, S., Poole, B. 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents. *Proc Natl Acad Sci USA*; 75:3327-3331.
- Ohno S, and Smith J.B.. 1964. Role of fetal follicular cells in meiosis of mammalian oocyte. *Cytogenetics*. 3:324-333.
- Okamoto, K. and Beach, D. 1994. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J*; 13:4816-4822.
- Oktay, K; Briggs, D and Gosden, R.G. 1997. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3748-3751.
- Olejnicka, B.T., Brunk, U.T. 1997. Starvation-induced autophagocytosis paradoxically decreases the susceptibility to oxidative stress to the very oxidative-stress-sensitive NIT insulinoma cells. *Diabetologia* (submitted).
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L. and Korsmeyer, S.J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerated programmed cell death. *Cell*; 74:609-619.
- Ollinger, K., Brunk, U.T. 1995. Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. *Free Radical Biol Med*; 19:813-822.
- Orr-Urtreger, A., Avivi, A., Zimmer, Y., Givol, D., Yarden, Y. and Lonai, P. 1990. Developmental expression of c-kit, a protooncogene encoded by the W locus. *Development*; 109: 911-923.
- Otsuka, K., Sodek, J. and Limeback, H. 1984. Synthesis of collagenase and collagenase inhibitors by osteoblast-like cells in culture. *Eur J Biochem*; 145:123-129.
- Paglin, S., Hollister, T., Delohery, T., Hackert, N., McMahon, M., Sphicas, E., Domingo, D., Yahalom, J. 2001. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*; 61:439-444.
- Palomba, L., Sestili, P., Cattabeni, F., Azzi, A. and Cantoni, O. 1996. Prevention of necrosis and activation of apoptosis in oxidatively injured human myeloid leukemia U937 cells. *FEBS Lett*; 390:91-94.
- Parrott, D.M.V. 1960. The effect of site of implantation on host reaction to ovarian homografts. *Immunology*; 3:244-253.

- Parrott, J.A. and Skinner, M.K. 1998. Thecal cell-granulosa cell interactions involve a positive feedback loop among keratinocyte growth factor, hepatocyte growth factor, and Kit ligand during ovarian follicular development. *Endocrinology*. 139:2240-2245.
- Parrott, J.A. and Skinner, M.K. 2000. Kit ligand action on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Molecular Reproduction and Development*; 55:55-64.
- Pederson, T. 1970. *Acta Endocrinol.* 64:304-323.
- Peluso, J.J., Charlesworth, J., England-Charlesworth, C. 1981. Role of estrogen and androgen in maintaining the preovulatory follicle. *Cell Tissue Res*; 216:614-624.
- Peng, X., Maruo, T., Samoto, T., Mochizuki, M. 1996. comparison of immunocytologic localization of insulin-like growth factor binding protein-4 in normal and polycystic ovary syndrome human ovaries. *Endocr J*; 43:269-278.
- Penninger, J.M. and Kroemer, G. 1998. Molecular and cellular mechanisms of lymphocytes apoptosis. *Advances in immunology*; 68:51-144.
- Pesce M. and De Felici M. 1994. Apoptosis in mouse primordial germ cells: a study by transmission and scanning electron microscope. *Anat Embryol (Berl)* 189:435-440.
- Pesce, M., Farrace, M.G., Piacentini, M., Dolci, S. and De Felici, M. 1993. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development*; 118:1089-1094.
- Peters, H. 1979. some aspects of early follicular development. In: Midgley, A.R., Sadler, W.A. editors. *Ovarian follicular development and function*. New York. Raven Press. pp 1-13.
- Peters, H.; Byskov, A. G. and Faber, M. 1973. Intraovarian regulation of follicle growth in the immature mouse. In: Peters, H, de. *The development and maturation of the ovary and its function*. Amsterdam: Excerpta Medica; 20-23
- Petit, P.X., Lecoq, H., Zorn, E., Daugey, C., Mignotte, B. and Gougeon, M-L. 1995. Alteration in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol*; 130:157-167.
- Petronilli, V., Cola, C. and Bernardi, P.J. 1993. *J Biol Chem*; 268:1011.
- Petronilli, V., Costantini, P., Scorrana, L., Colonna, R., Passamonti, S. and Bernardi, P. 1994. *J Biol Chem*; 269:16638-16642.
- Pianzola, M.J., Soubes, M. and Touati, D. 1996. Overproduction of the rbo gene product of lack of superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*; 178:6736-6742.
- Picton, H.M.; Tsonis, C.G. and McNeilly, A.S. 1990. FSH causes a time-dependent stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist *Journal of Endocrinology*; 126:297-307.
- Pike, C.J. 1999. Estrogen modulates neuronal Bcl-XL Expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's Disease. *J neurochem*; 72:1552-1563.
- Pincus, G. and Enzmann, E.V. 1937. The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit. *J Morphol*; 61:351-383.
- Pitzer, F., Dantes, A., Fuchs, T., Baumeister, W. and Amsterdam, A. 1996. Removal of proteosomes from the nucleus and their accumulation in apoptotic blebs during programmed cell death. *FEBS Lett*; 394:47-50.
- Plomp, P.J.A., Wolvetang, E.J., groen, A.K., Meijer, A.J., Gordon, P.B. and Seglen, P.O. 1988. Energy dependence of autophagic protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem*; 164:197-203.

- Porter, A.G. and Jänicke, R.U. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Diff*; 6:99-104.
- Porter, A.G., Ng, P. and Janicke, R.U. 1997. Death substrates come alive. *BioEssays*, 19:501-507.
- Pushkareva, M., Obaid, L. and Hannun, Y.A. 1995. Ceramide: a endogenous regulator of apoptosi and growth supression. *Immunol Today*; 16:294-297.
- Pytela, R., Pierschcher, M.D., and Ruoslahti, E. 1985. A 125/115 kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the Arg-Gly-Asp adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA*; 82:5766.
- Qian, T., Herman, B., Lemasters, J.J. 1996. Br-A23187 toxicity in hepatocites: role of the mitochondrial permeability transition (MPT). *Fund Appl Toxicol*; 30(Suppl):88.
- Quirk, S.M., Cowan, R.G., Joshi, S.G. and Henrikson, K.P. 1995. Fas antigen-mediated apoptosis in human granulosa/lutea cells. *Biol Reprod*; 52:279-287.
- Rabinovici, J., Spencer, S.J., Doldi, N., Goldsmith, P.C., Schwall, R. and Jaffe, R.P. 1992. Activin- A as an intraovarian modulator: action, localitation, and regulation of the intac dimer in human ovarian cells. *J. Clin Invest*; 89:1528-1536.
- Rahi, H. and Srivastava, P.N. 1984. Lysosomal hydrolases in reproductive organs during estrous cycle of the hamster. *Gamete Res*; 10:57-66.
- Rajakoski, E. 1996. The ovarian Follicular system in sexual mature heifers with special reference to season, cyclical and leaft-right variation. *Acta Endocrinol Suppl*; 52:1-68.
- Ratts, V.S., Flaws, J.A., Kolp, R., Sorenson, C. and Tilly, J.L. 1995. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of ppcytes and the primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology*; 136:3665-3668.
- Reed, D.J. and Savage, M.K. 1995. Influence of metabolic inhibitors on mitochondrial permeability transition and glutathion status. *Biochim Biophys Acta*; 1271:43-50.
- Reers, M., Smith, T.W., Chen, B.L. 1991. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, 30:4480-4486.
- Rehemtulla, A., Hamilton, C., Chinnaiyan, A.M. and Dixit, V.M. 1997. Ultraviolet ration-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (Fas/APO-1). *J Biol Chem*; 272:25783-25786.
- Ren, Y., Silverstein, R.L., Allen, J. and Savill, J. 1995. CD36 gene trasfer confers capacity for phagocytes of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med*; 181:1857-1862.
- Renvoizé, C., Biola, A., Pallardy, M. and Bréard, J. 1998. Apoptosis: Identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol*; 14:111-120.
- Reynolds, J.E., Yang, T., Qian, L., Jenkinson, J.D., Zhou, P., Eastman, A. and Craing, R.W. 1994. Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in chinese hamster ovary cells. *Cancer Res*; 54:6348-6352.
- Richards, J.S. 1980. Maturation of ovarian follicles: action and interaction of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol Rev*; 60:51-89.
- Richards, J.S. 1994. Hormonal control of gene expression in the ovario. *Endocr. Rev.* 15:725-751.
- Richert, N.D. and Ryan, R.J. 1977. *Proc natl Acad Sci (USA)* 74:4857-4861.
- Richter, C., Schweizer, M., Cossarizza, A., Franceschi, C. 1996. Control of apoptosis by cellular ATP level. *FEBS Lett*; 378:107-110.
- Rigotti, A., Acton, S.L. and Krieger, M. 1995. The class B scavenger receptor SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. *J Biol Chem*; 270:16221-16224.

- Rigotti, A., Trigatti, B.L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J. and Krieger, M. 1997. A targeted mutation in the murine gene encoding the high density lipoprotein (HDL) receptor scavenger receptor class B type reveals its key role in HDL metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:12610-12615.
- Robbins, E. and Marcus, P.I. 1963. Dynamics of acridine orange-cell interaction. I. Interrelation of acridin orange particles and cytoplasmic reddening. *J Cell Biol*; 18:237-250.
- Roberg, K., Jahansson, U., Öllinger; K. 1999. Lysosomal released of cathepsin D precede relocation of citocromo c and loss of mitochondrial trasmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *free Radic Biol Med*; 27:1228-1237.
- Roberg, K., Öllinger, K. 1998. Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensiung apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Pathol*; 152:1151-1156.
- Robertson, R.N. 1983. *The lively membranes*. Cambridge University Press, Cambridge. pp 1-42.
- Robles, R., Tao, X.J. Trbovich, A.M., Marabel, D.V., Nahum, R., Perez, G.I., Tilly, K.I. and Tilly, J.L. 1999. Localization, regulation and possible consequences of apoptotic orotease-activating factor-1 (Apaf-1) expression in granulosa cells of the mouse ovary. *Endocrinology*; 140:2641-2644.
- Roby, K.F. and Terranova, P.F. 1990. Effects of tumor necrosis factor-alpha in vitro on steroidogenesis of healthy and atretic follicles of rat: theca as a target. *Endocrinology*; 126:2711-2718.
- Rombauts, I.; Suikkari, A.M; MacLachlan, V; Trounson, A.O. and healy, D.L. 1998. Recruitment of follicles by recombinant human follicle-stimulating hormone commencing in the luteal phase of the ovarian cycle. *Fertl Steril* 69:665-669.
- Rosale-Torres, A.M., Avalos-R. A., Vergara-O.M., Hernández-P. O., Ballesteros L.M., García-M. R., Ortíz-N. V. and Rosado A. 2000. Multiparametric study of atresia in ewe antral follicles: Histology, flow cytometry, internucleosomal DNA fragmentation, and lysosomal enzyme activities in granulosa cells and follicular fluid. *Mol Reprod Dev*; 55:270-281.
- Rosales, A.M. y Rosado, A. 1989. Bioquímica de la maduración folicular en el mamífero. *Ciencia*; 40:275-288.
- Rosales, A.M., Hernandez-Perez, O., Dominguez, R., Mercado, E. and Rosado, A. 1990. Protecolitic and antiprotecolitic in Goat antral follicles. *Animal Reproduction Science*; 23:213-222.
- Rotello, R.J., Hockr, M.B., Gerschenson, L.E. 1989. Biochemical evidence for programmed cell death in rabbit uterine epithelium. *Am J Pathol*; 134:491-495.
- Rouillier, P., matton, P., Sirard, M.A. and Guilbault, L.A. 1996. Follicle-stimulating hormone-induced estradiol and progesterone production by bovine antral and mural granulosa cells cultured in vitro in a completely defined medium. *J Anim Sci*, 74:3012-3019.
- Roy K.S. and Grewald, G.S. 1987. In vitro steroidogenesis by primary to antral flicles in the hamster during the periovulatory period: effects of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, and prolacting. *Biol Reprod*; 37:39-46.
- Roy K.S. and Grewald, G.S. 1990. Inmmunohistochemical localization of epidermal growth factor-like activity in the hamster ovary with a polyclonal antibody. *Endocrinology*. 126:1309-1317.

- Roy, S.K and Greenwald, G.S. 1991a. In vitro effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-1, fibroblast growth factor, and follicle stimulating hormone on hamster follicular deoxyribonucleic acid synthesis and steroidogenesis. *Biol Reprod*; 44:889-896.
- Roy, S.K. and Greenwald, G.S. 1989. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. *J Reprod Fertl*; 87:103-114.
- Roy, S.K. and Greenwald, G.S. 1991b. Mediation of follicle-stimulating hormone action on follicular deoxyribonucleic acid synthesis by epidermal growth factor. *Endocrinology*; 129:1903-1908.
- Rück, A., Dolder, M., Wallimann, T. and Brdiczka, D. 1998. Reconstituted adenine nucleotide translocator forms a channel for small molecules comparable to the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett*; 426:97-101.
- Rueda, B.R., Wegna, J.A., Marion, S.L., Wahlen, D.D., Hoyer, P.B. 1995. Internucleosomal DNA fragmentation in ovine luteal tissue associated with luteolysis: in vivo and in vitro analyses. *Biol Reprod*; 52:305-312.
- Rundquist, I., Olsson, M. and Brunk, U. 1984. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*; 92:303-309.
- Rutishauser, U., Acheson, A., Hall, A.K. Mann, D.M. and Sunshine, J. 1988. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interaction. *Science*; 240:53-57.
- Ryan, R.J. 1981. Follicular atresia: some speculations of biochemical marks and mechanisms. In: Schwartz, N.B. Hunzicker-Dunn, M.(eds) *Dynamics of ovarian function*. New York: Raven Press.
- Ryan, R.J., Lee, C.Y. 1976. The role of membrane bound receptors. *Biol Reprod*; 14:16-29.
- Sacki, K., Yuo, A., Susin, S.A. Takaku, F., Yazaki, Y., Kroemer, G., Okuma, E. 2001. Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic hl60 cells. *Cell Death Diff*; 7:1263-1269.
- SAGAR, 1998 (<http://www.sagar.gob.mx/Dgg/borrego.htm>).
- SAGAR, 2000 (<http://www.sagar.gob.mx/Dgg/DpCar.htm>).
- SAGAR, 2000, Información Estadística Ganadera (<http://www.sagar.gob.mx/Dgg/ganind3.htm>).
- Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitors in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*; 391:96-99.
- Sakahira, H., Enari, M., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. and Nagata, S. 1999. Apoptotic nuclear morphological changes without DNA fragmentation. *Curr Biol*; 9:543-546.
- Sakaida, I., Kyle, M.E., Farber, J.L. 1990. Autophagic degradation of protein generates a pool of ferric iron required for the killing of cultured hepatocytes by an oxidative stress. *Mol Pharmacol*; 37:435-442.
- Samali, A., Nordgren, H., Zhivotovsky, B., Peterson, E. and Orrenius, S. 1999. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Bioch Bioph Res Commun*; 255:6-11.
- San R.G.A. and Magoffin, D.A. 1993. Insulin-like growth factor-binding proteins in healthy and atretic follicles during natural menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab*; 76:625-632.
- Santana, P., Llanes, L., Hernandez, I., Gallardo, G., Quintana, J., Gonzalez, J., Estevez, F., Ruiz de Galarreta, C., Fanjul, L.F. 1995. Ceramide mediates tumor necrosis factor effects on P450-aromatase activity in cultured granulosa cells. *Endocrinology*; 136:2345-2348.

- Santana, P., Llanes, L., Hernandez, I., Gonzalezrobayna, I., Tabraue, C., Gonzalezreyes; J., Quintana, J., Estevez, F., Degalarreta, C.M.R. and Fanjul, L.F. 1996. Interleukin-1.β stimulates sphingomyelin hydrolysis in cultured granulosa cells-evidence for a regulatory role of ceramida on progesterone and prostaglandin biosynthesis. *Endocrinology*; 137:2480-2489.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P. and Haslett, C. 1993. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*; 14:131-136.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K-M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathway. *EMBO (Eur Mol Biol Organ) J*; 17:1675-1687.
- Scaramuzzi, R.J; Adams, n.R, Baird, D.T, Campbell, B.K; Downing, J.A; Findlay, J.K; Henderson, K.M, Martin, G.B; McNatty, K.P; Mencilly, A.S and Tsonis, C.G. 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev*; 5:459-478.
- Schanne, F.A.X., Kane, A.B., Young, E.E., Farber, J.L. 1979. Calcium dependence of toxic cell death. a final common pathway. *Science (Wash. D.C.)*; 206:700-702.
- Schellens, J.P.M. and Meijer, A.J. 1991. Energy depletion and autophagy cytochemical and biochemical studies in isolated rat hepatocytes. *Histochem J*; 23:460-466.
- Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Monta, M. and Reed, J. 1997. Channel formation by antiapoptos protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:5113-5118.
- Schlegel, R.A., Stevens, M., Lumley-Sapansky, K. and Williamson, P. 1993. *Immunol Lett*; 36:283-288.
- Schuller, A.G.P., Lindenbergh-Kortleve, D.J., Pache, T.D., Zwarthoff, E.C., Fauser, B.C.J.M. and Drop, S.L.S. 1993. Insulin-like growth factor binding protein-2, 28 kDa and 24 kDa insulin-like growth factor binding protein levels are decreased in fluid of dominant follicles, obtained from normal and polycystic ovaries. *Regul Pept*; 48:157-163.
- Schwartz, N.B. 1974. The role of FSH and LH and of their antibodies on follicular growth and on ovulation. *Biol Reprod*; 19:236-276.
- Schwartzman, R.A., and Cidlowski, J.A. 1993. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Rev*; 14:133-151.
- Schweichel, J.U. and Merker, H.J. 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*; 7:253-266.
- Sentman, C.L., Shutter, J.R., Hockenberry, D., Kanagawa, O. and Korsmeyer, S.J. 1991. bcl-2 inhibits multiple forms of apoptotisis but not negative selection in thymocytes. *Cell*; 67:879-888.
- Sgorbissa, A., Benetti, R., Marzinotto, S., Schneider, C. and Brancolini 1999. Caspase-3 and caspase-7 but not caspase-6 cleave Gas2 in vitro implication for microfilament reorganization during apoptosis. *J Cell Sci*; 112:4475-4482.
- Sherratt, H.S.A. 1991. Mitochondrial: structure and function. *Rev Neurol (Paris)*; 147:417-430.
- Shibahara, T., Sato, N., Waguri, S., Iwanaga, T., Nakahara, A., Fuutomi, H. and Uchiyama, Y. 1995. The fate of effete epithelial cells at the villus tips of the human small intestine. *Arch Histol Cytol*; 58:205-219.
- Shibata, M., Kanamori, S., Isahara, K., Ohsawa, Y., Konishi, A., Kamataka, S., Watanabe, T., Ebisu, S., Ishido, K., Kominami, E., Uchiyama, Y. 1998. Participation of cathepsin B and D in apoptosis of PC12 cells following serum deprivation. *Bioch Biophys Res Commun*; 251:199-203.

- Shikone, T., Matzuk, M., Perlas, E., Finegold, M.J., Lewis, K.A., Vale, W., Bradley, A. and Hsueh, A.J.W. 1994. Characterization of gonadal sex-stromal tumor lines from inhibin- α and p53-deficient mice: the role of activin as an autocrine growth factor. *Mol Endocrinol*; 8:983-995.
- Shimizu, A., Kawashima, S. 1989. Derivation and application of mathematic model for kinetics of ^{131}I -follicle-stimulating hormone bound to receptors. *J Biol Chem*; 264:13632-13638.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Funahashi, Y., Mignon, A., Lacronique, V., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. 1998. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:1455-1459.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kamiike, W., Itoh, Y., Hasegawa, J., Yamabe, K., Otsuki, Y., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. 1996. Induction of apoptosis as well as necrosis by hypoxia and predominant prevention of apoptosis by Bcl-2 and Bcl-xL. *Cancer Res*; 56:2161-2166.
- Shimizu, S., Matsuoka, Y., Shinohara, Y., Yoneda, Y. and Tsujimoto, 2001. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J Cell Biology*; 152:237-250.
- Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. 1999. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *nature*; 399:483-487.
- Shimonaka, M., Inouye, S., Shimasaki, S. and Ling, N. 1991. Follistatin bind to both activin and inhibin through the common beta-subunit. *Endocrinology*; 128:3313-3315.
- Shulze-Osthoff, K., Bakker, A.C., Vanhaesebroeck, B., Beyart, R., Jacob, W.A., Fiers, W. 1992. cytotoxic activity of tumor necrosis factor is the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem*; 267:5317-5323.
- Sicinski, P., Donaher, J.L., Geng, Y., Porker, S.B., Gardner, H., Park, M.Y., Robker, R.L., Richards, J.S., McGinnis, L.K., Biggers, J.D., Eppig, J.J., Bronson R.T., Elledge, S.J., Weinberg, R.A. 1996. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature*; 384:470-474.
- Siliciano, J.D., Canman, C.E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. 1997. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev*; 11:3471-3481.
- Silverstein, S.C., Steinman, R.M., Cohn, Z.A. 1977. Endocytosis. *Annu Rev Biochem*; 46:669-722.
- Simon, A.M; Goodenough, D.A; Li, E. and Paul, D.L. 1997. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*; 385:525-529.
- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Sci*; 175:720-731.
- Skinner, M.K; Lobb, D. and Dorrington, J.H. 1987 Ovarian thecal/intrastitial cells produce an epidermal growth factor-like substance. *Endocrinology*; 121:1892-1899.
- Skowronek, P., Haferkamp, O. and Rodel, G. 1992. A fluorescence-microscopic and flowcytometric study of HeLa cells with an experimentally-induced respiratory deficiency. *Biochem Biophys Res Commun*; 187:991-998.
- Slater, A.F.G., Nobel, C.S.I., Orrenius, S. 1995. The role of intracellular oxidants in apoptosis. *Biochim Biophys Acta*; 1271:59-62.
- Smith, C.A., Farrah, T. and Goodwin, R.G. 1994. The TNFR superfamily of cellular and viral proteins: activation, co-stimulation and death. *Cell*; 76:959-962.
- Smith, J.A., Waynforth, H.B. 1970. Acid phosphatase activity in viable and regressing rat corpora lutea. *J Endocrinol*; 47:167-176.

- Smith, M.W., Collan, Y., Kahng, M.W. Trump, B.F. 1980. Changes in mitochondrial lipids of rat kidney during ischemic. *Biochim Biophys Acta*; 618:192-201.
- Somlyo, A.P., Bond, M. and Somlyo. A.V. 1985. Calcium content of mitochondria and endoplasmic reticulum in liver frozen rapidly in vivo. *Nature*; 314:622-625.
- Song, Q., Kuang, Y., Dixit, M. and Vincenz, C., 1999. Boo, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1. *EMBO J*; 18:167-178.
- Soto, E.A., Kliman, H.J., Strauss, J.F. III. and Paavola, L.G. 1986. Gonadotropins and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate (cAMP) alter the morphology of cultured human granulosa cells. *Biol Reprod*; 34:559-569.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandez-Almemri, T., Litwack, G. and Alnemri, E.S. 1996. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:14486-14491.
- Starke, P.E., Farber, J.L. 1985. Ferric iron and superoxide ions are required for the killing of cultured hepatocytes by hydrogen peroxide. Evidence For the participation of hydroxyl radicals formed by an iron-catalyzed Haber-Weiss reaction. *J Biol Chem*; 260:10099-10104.
- Stemans, M., Goossens, V., Van de Craen, M., Van Herreweghe, F., Vancompernelle, K., De Vos, K., Vandenaabeele, P and Grooten, J. 1998. A caspase-activated factor (CAF) induces mitochondrial membrane depolarization and cytochrome c release by a nonproteolytic mechanism. *J Exp Med*; 188:2193-2198.
- Steller, H. 1998. Artificial death switches: induction of apoptosis by chemically induced caspase multimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:5421-5422.
- Stenn, K.S. 1983. The skin. In: *WissL (de) Histology: Cell and tissue biology*, de 5. Elsevier, New York, pp 569-606.
- Stocco, D.M. and Clark, B.J. 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev*; 17:221-244.
- Stouffer, R.L., Woodruff, T.K., Dahl, K.D., Hess, D.L., Mather, J.P. and Molskness, T.A. 1993. Human recombinant activin-A alters pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion, follicular development, and steroidogenesis, during the menstrual cycle in rhesus monkeys. *J Clin Endocrinol Metab*; 77:241-248.
- Streilein, J.W. 1995. Unravelling immune privilege. *Science*; 270:1158-1159.
- Strickland, S. and Beers, W.H. 1976. Studies on the role of plasminogen activator in ovulation. *J Biol Chem*; 251:5649-5702.
- Suda, T. and Nagata, S. 1994. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J. Exp Med*; 179:873-879.
- Suda, T., Takahashi, T., Gostein, P. and Nagata, S. 1993. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*; 75:1169-1178.
- Sugino, H., Nakamura, T., Hasegawa, Y., Miyamoto K., Abe, Y., Igarashi, M., Eto, Y., Shibai, H. and Titani, K. 1988. Erythroid differentiation factor can modulated follicular granulosa cell functions. *Biochem Biophys Res Commun*; 153:281-288.
- Sun, C.; Cai, M., Meadows, R.P., Xu, N., Gunasekera, A.H., Hermann, J., Wu, J.C. and Fesik, S.W. 2000. NMR structure and mutagenesis of the third bir domain of the proapoptotic genes rpr, hid, and grim. *Mol Cell Biol*; 20:2907-2914.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zanzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski,

- D.P., Penninger, J.M. and Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *nature*; 397:441-446.
- Susin, S.A., Zamzami, N. and Kroemer, G. 1996. The cell biology of apoptosis: evidence for the implication of mitochondria. *Apoptosis*; 1:231-242.
- Susin, S.A., Zanzami, N. and Kroemer, G. 1998. Mitochondrial regulation of apoptosis. Doubt no more. *Biochim Biophys Acta (Bioenergetics)*; 1366:151-165.
- Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki, T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azauma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura, H., Yazaki, Y., Horiuchi, S., Takahashi, K., Kar, K.J., van Berkel, T.J.C., Steinbrecher, U.P., Ishabashi, S., Maeda, N., Gordon, S. and Kodama, T. 1997. A role for macrophage scavenger receptor in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature*; 386:292-296.
- Svensson, P.-A., Johnson, M.S.C., Ling, C., Carlsson, L.M.S., Billig, H., and Carlsson, B. 1999. Scavenger receptor class B type I in the rat ovary: Possible role in high density lipoprotein cholesterol uptake and the recognition of apoptotic granulosa cells. *Endocrinology*; 140:2494-2500.
- Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assamunt, N., Salvesen, G.S. and Reed, J.C. 1998. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspase. *J Biol Chem*; 273:7787-7790.
- Takahashi, A., Alnemri, E.S., Lazebnik, Y.A., Fernandez, Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R.D., Goldman, G.G., Poirier, S.H., Kaufmann, S.H., Earnshaw, W.C. 1996. Cleavage of lamin A by Mch2apha but not CPP32: multiple recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93:8395-8400.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y. 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and condition for its induction. *J Cell Biol*; 119:301-311.
- Tam, P.P.L., Snow, M.H.L. 1981. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*; 64:133-147.
- Tan, X. and Wang, J.Y.J. 1998. The caspase-RB connection in cell death. *Trends Cell Biol*; 8:116-120.
- Tang, X.J., Halleck, M.S., Schlegel, R.A. and Williamson, P. 1996. *Science*; 272:1495-1497.
- Tappel, A.L. 1972. Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Ann N.Y. Acad Sci*; 203:12-28.
- Terpstra, V., Kondratenko, N. and Steinberg, D. 1997. Macrophages lacking scavenger receptor A show a decrease in binding and uptake of acetylated low-density lipoprotein and of apoptotic thymocytes, but not of oxidatively damaged blood cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:8127-8131.
- Terranova, P.F. 1981. Steroidogenesis in experimentally induced atretic follicles of the hamster: a shift from estradiol to progesterone synthesis. *Endocrinology*; 108:1885-1890.
- Testi, R. 1996. Sphingomyelin breakdown and cell fate. *Trends Biol Sci*; 21:468-471.
- Thompson, C.B. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. *Sci*; 267:1456-1462.
- Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y., 1998. Caspases: enemies within. *Science*; 281:1312-1316.

- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T. and Nicholson, D.W. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. *J Biol Chem*; 272:17907-17911.
- Tilly, J.L. 1996. Apoptosis and ovarian function. *Reviews of reproduction*; 1:162-172.
- Tilly, J.L. Billing, H., Kowalski, K. I., Hsueh, A.J.W 1992b. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol*; 6:1942-1950.
- Tilly, J.L., Kowalski, K.I., Johnson, A.L. and Hsueh, A.J. W. 1991. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*; 129:2799-2801.
- Tilly, J.L., Kowalski, K.I., Schomberg, D.W. and Hsueh, A.J.W. 1992. Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology*; 131:1670-1676.
- Tilly, J.L., Tilly, K.I. Kenton, L.M. and Johnson, A.L. 1995a. Expression of the bcl-2 gene familia in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-x.long messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*; 136:232-241.
- Tilly, K.I., Banerjee, S., Banerjee, P.P. and Tilly, J.L. 1995b. Expression of the p53 and Wilms' tumor suppressor genes in the rat ovary: gonadotropin repression in vivo and immunohistochemical localization of p53 protein to apoptotic granulosa cells of atretic follicles. *Endocrinology*; 136:1394-1402.
- Tinnemans, M.M.F.J., Lenders, M.H.J.H. ten Velde, G.P.M., Ramaekers, F.C.S. and Schutte, B. 1995. Alterations in cytoskeletal and nuclear matrix-associated proteins during apoptosis. *Eur J Cell Biol*; 68:35-46.
- Tisdall, D.J., Smith, P., Leeuwenberg, B., McNatty, K.P. 1995a. FSH-receptor, beta-B inhibin subunit, follistatin, beta-A and alpha inhibin subunits and IGF-I genes are expressed sequentially in ovine granulosa cells during early follicular development. *J. Reprod Fertil*; 15:12.
- Tisdall, D.J., Watanabe, K., Hudson, N.L., Smith, P., McNatty, K.P. 1995b. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J. Endocrinol*; 15:273-281.
- Tonetta, S.A. and diZerega, G.S. 1989. Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocr Rev*; 10:205-229.
- Towatari, T., Nikawa, T., Murata, M., Yokoo, C., Tamal, M., Hanada, K., Katunama, N. 1991. Novel epoxysuccinyl peptides: a selective inhibitor of cathepsin B in vivo. *FEBS Letter*; 280:311-315.
- Traganos, F. and Darzynkiewicz, Z. 1994. Lysosomal proton pump activity: supravital cell staining with acridine orange differentiates leukocytes subpopulations. *Meth Cell Biol*; 41:185-194.
- Trump, B.F., Arstila, A.U., 1975. Cell membranes and disease processes. In: *Pathobiology of cell membranes* (ed. by Trump, B.F. and Arstila, A.U.), Vol. 1, pp. 1-103. New York: Academic Press.
- Trump, B.F., Berezsky, I.K. and Cowley, R.A. 1982. The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium. In:

- Cowley, R.A., Trump, B.F. (eds) Pathophysiology of shock, anoxia, and ischemia. Williams & Wilkins. Baltimore, M.D. pp 6-46.
- Tsafriri, A. 1997. Follicular development: impact on oocyte quality. In: Fauser BCJM (de) FSH Action and intraovarian regulation. Parthenon Press, New York, pp 83-105.
- Tsafriri, A. and Braw, R.H. 1984. Experimental approaches to atresia in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol*; 6:226-265.
- Tsafriri, A. and Eckstein, B. 1986. Changes in follicular steroidogenic enzyme following the preovulatory surge of gonadotropins and experimentally-induced atresia. *Biol Reprod*. 34:783-787.
- Tsonis, C.G., Carson, R.S. and Findlay, J.K. 1984. Relationships between aromatase activity, follicular fluid oestradiol-17beta and testosterone concentrations and diameter and individual ovine follicles. *J Reprod Fertil*; 72:153-163.
- Tsujiimoto, Y. 1997. Apoptosis and necrosis-intracellular ATP levels as a determinant for cell death modes. *Cell Death Diff*; 4:429-439.
- Tsujiimoto, Y. and Shimizu, S. 2000. VDAC regulation by the Bcl-2 family of protein. *Cell Death Differ*; 7:1174-1181.
- Tsujiimoto, Y., Shimizu, S., Euguchi, Y., Kamiike, W. and Matsuda, H. 1997. Bcl-2 and Bcl-XL block apoptosis as well as necrosis: possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathway. *Leukemia*; 11 Suppl; 3:380-382.
- Tuckey, R.C. and Holland, J.W. 1989. Comparison of pregnenolone synthesis by cytochrome P-450_{sc} in mitochondria from porcine corpora lutea and granulosa cells of follicles. *J Biol Chem*; 264:5704-5709.
- Turnbull, A.E; Braden, A.W.H. and Mattner, P.E. 1977. The Pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust. J. Biol. Sci*; 30:229-241.
- Uilenbroek, J.T., Woutersen P.J. and van der Schoot, P. 1980. Atresia of preovulatory follicles: gonadotropin binding and steroidogenic activity. *Biol Reprod*; 23:219-229.
- van Ebgeand, M., Kuijpers, H.J.H., Ramaekers, F.C., Reutelingsperger, C.P. and Schutte, B. 1997. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp Cell Res*; 235:421-430.
- Van Lancker, J.L. 1975. Hydrolase and cellular death. In: Pathogenesis and mechanisms of liver cell necrosis. Keppler, D. (ed). MTP Press Ltd., Lancaster, Great Britain; pp 25-35.
- Van Nassauw, Tao, L. and Harisson, F. 1999. *Acta Histochem*; 101:103-112.
- Van Wageningen G, Simpson, M.E. 1965. Embryology of the Ovary and Testis; *Homo sapiens and Macaca mulatta*. Yale University Press, New Haven, C.T.
- van Wezel, I.L., Dharmarajan, A.M., Lavreanos, T.C. and Rodgers, R.J. 1999. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. *Endocrinology*; 140:2602-2612.
- Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T., and Thompson, B. 1997. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*; 91:627-637.
- Vanege, D.M., Ponnare, M.I., Coppola, S., Burgess, D.H. and Orrenius, S. 1996. *J Biol Chem*; 271:31075-31085.
- Vantighem, A., Assafa, Z., Vandenberghe, P., Declercq, W., Courtois, S., Vandenberghe, J.R., Merlevede, W., de Witte, P. and Agostinis, P. 1998. Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis. Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. *FEBS Lett*; 440:19-24.

- Vargas, J.L., Roche, E., Knecht, E., Grisolia, S. 1987. Differences in the half-lives of some mitochondrial rat liver enzymes may derive partially from hepatocytes heterogeneity. *FEBS Lett*; 224: 182-186.
- Vaux, D.L., Aguila, H.L. and, Weissman, I.L. 1992. Bcl-2 prevents death of factor-deprived cells but fail to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing. *Int J Immunol*; 4:821-824.
- Vaux, D.L., Cory, S., Adams, J.M. 1988. bcl-2 gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*; 335:440-442.
- Vayssier, M., Banzet, N., Francois, D., Bellmann, K. and Polla, B.S. 1998. Tobacco smoke induce both apoptosis and necrosis in mammalian cells:differential effects of HSP70. *Am J Physiol*; 275(Lung Cell Mol Physiol, 19):L771-L779.
- Vayssière, J.L., Petit, P.X., Risler, Y. and Mignotte, B. 1994. Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell conditionally immortalized with simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA*; 91:11752-11756.
- Verhagen, A.M., Eker, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Vaux, D.L. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP protein. *Cell*; 102:43-53.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M. Haimovitz-Fridman, A., Fuks, Z., Kolesnick, R.N. 1996. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature(London)*;380:75-79.
- Verhoven, B., Schlegel, R.A., Williamson, P. 1995. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med*; 182:1597-1601.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutelingsperger, C. 1995. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. *J Immunol Meth*; 184:39-51.
- Wadia, J.S., Chalmers-Redman, R.M.E., Ju, W.J.H., Carlile, G.W., Phillips, J.L., Fraser, A.D. and Tatton, W.G. 1998. Mitochondrial membrane potential and nuclear changes in apoptosis caused by serum and nerve growth factor withdrawal: time course and modification by (-)-deprenyl. *J Neuroscience*; 18:932-947.
- Waga, S., Hannon, G.R., Beach, D. and Stillman, B. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*; 369:574-578.
- Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobé, G.C. and Kerr, J.F.R. 1988. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*; 13:18-54.
- Wallach E.E. and Noriega, C. 1970. Effects of local steroids on follicular development and atresia in the rabbit. *Fertil Steril*; 21:253-267.
- Wang, K., Yin, X-M., Chao, D.T., Milliman, C.L. and Kormeyer, S.J. 1996. BID: a novel B113 domain-only death agonist. *Genes Dev*; 10:2859-2869.
- Wang, K.K.W., Posmantur, R., Nath, R., McGinnis, K., Whitton, M., Talanian, R.V., Glantz, S.B. and Morrow, J.S. 1998. Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem*; 273:22490-22497.
- Wang, L.J., Pascoe, V., Petrucco, O.M., Norman, R.J. 1992. Distribution of leukocyte subpopulation in the human corpus luteum. *Hum Reprod*; 7:197-202.

- Wang, X.N. and Greenwald, G.S. 1993a. Hypophysectomy of the cyclic mouse. I. Effects on folliculogenesis, oocyte growth, and follicle-stimulating hormone and human chorionic gonadotropin receptors. *Biol Reprod* 48:585-594..
- Wang, X.N. and Greenwald, G.S. 1993b. Synergistic effects of sterpoids with FSH on folliculogenesis, steroidogenesis and FSH- and hCG- receptors in the hypophysectomized mouse *J Reprod Fertil*; In press.
- Wasarman P.M. and Albertin F.D. 1994. The mammalian ovum. En *Physiology of Reprod.* 2da de edited by Knobil, E. and Neill, J.D. Raven Press Ltd NY pp 79-122.
- Watanabe, N., Neda, H., Ohtusuka, Y., Sone, H., Yamauchi, N., Maeda, M., Kuriyama, H. and Niitsu, Y. 1989. Signaling pathways of TNF in normal and tumor cells. *Cancer Immunolo Immunother.* 28:157-163.
- Watanabe, N., Niitsu, Y., Neda, H., Sone, H., Yamauchi, N., Macda, M. and Urushizaki 1988. Cytotoxic mechanism of TNF: effects of lysosomal enzyme and hydroxyl radical inhibitors on cytotoxicity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*; 1:109-116.
- Waterhouse, N.J., Finucane, D.M., Green, D.R., Elce, J.S., Kumar, S., Alnemri, E.S., Litwack, G., Khanna, K.K., Lavin, M. and Watters, D.J. 1998. Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis. *Cell Death Diff*; 5:1051-1061.
- Weisiger, R.A. and Fridovich, I. 1973. Mitochondrial superoxide dismutase, site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem*; 248:4793-4796.
- Weiss, L. 1988. The life cycle of blood cells. In: Wess, L. (ed) *Cell and Tissue Biology: A Textbook of histology*, ed 6, Urban and Schwarzenberg, Baltimore, pp 445-466.
- Weissman, G., Zurier, R.B., Spieler, P.-J., Goldstein, I.M. 1971. Mechanisms of lysosomal enzyme release from leukocytes exposed to immune complexes and other particles. *J Exp Med*; 134(Suppl):149s-169s.
- White, E. 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev*; 10, 1-15.
- Wiesen, J.F. and Midgley, A.R.J. 1994. Expression of connexin 43 gap junction messenger ribonucleic acid protein during follicular atresia. *Biol Reprod*; 50:336-348.
- Wilson, P.D., Firestone, R.A., Lenard, J. 1987. The role of lysosomal enzymes in killing of mammalian cells by the lysosomotropic detergent N-dodecylimidazol. *J Cell Biol*; 104:1223-1229.
- Wise, T. 1987. Biochemical analysis of bovine follicular fluid: albumin, total protein, lysosomal enzymes, ions, esters and ascorbic acid content in relation to follicular size, rank, atresia classification and day of estrous cycle. *J Anim Sci*; 64:1153-1169.
- Witty, J.P., Bridgham, J.T. and Johnson, A.L. 1996. Induction of apoptotic cell death in hen granulosa cells by ceramide. *Endocrinology*; 137:5269-5267.
- Wolf, B.B., Schuler, M., Echeverri, F. and Green, D.R. 1999. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated Dnase inactivation. *J Biol Chem*; 274:30651-30656.
- Wong, G.H.W., Elwell, J.H., Oberley, L.W. and Goeddel, D.V. 1989. Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell*; 58:923-931.
- Woo, M., Hakem, A., Elia, A.J., Hakem, R., Duncan, G.S., Patterson, B.J. and Mak, T.W. 1999. In vivo evidence that caspase-3 is required for Fas-mediated apoptosis of hepatocytes. *J Immunol*; 163:4909-4916.
- Woodruff, T.K. Lyon, R.J., Hansen, S.E. Rice, G.C. and Mather, J.P. 1990. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. *Endocrinology*; 127:3196-3205.

- Wright, S.C., Zheng, H., Zhong, J. 1996. Tumor cell resistance to apoptosis due to a defect in the activation of a phospholipase and the 24 kDa apoptotic protease (AP24). *FASEB J*; 10:325-332.
- Wyllie, A.H. 1981. Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. In: Bowen, I.D., Lockshin, R.A. (eds) *Cell death in biology and pathology*; Chapman & Hall, London. pp 9-34.
- Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*; 284:555-556.
- Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. and Currie A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 68:251-306.
- Xiao, S. and Findlay, J.K. 1992a. Modulation of differentiation of rat granulosa cells in vitro by interferon-gamma. *J Endocrinol*; 133:131-139.
- Xiao, S., Findlay, J.K. and Robertson, D.M. 1990. The effect of bovine activin and follicle-stimulating hormone (FSH) suppressing protein/follistatin on FSH-induced differentiation of rat granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol*; 69:1-8.
- Xiao, S., Robertson, D.M. and Findlay, J.K. 1992b. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*; 131:1009-1016.
- Xu, Z.Z., Garverick, H.A., Smith, G.W., Smith, M.F., Halmilton, S.A. and Youngquist, R.S. 1995. Expression of messenger ribonucleic acid encoding cytochrome P450 side-chain cleavage, cytochrome P450 17 α -hydroxylase, and cytochrome P450 aromatase in bovine follicles during the first follicular wave. *Endocrinology*; 136:981-989.
- Xu, Z.Z., Garverick, H.A., Smith, G.W., Smith, M.F., Halmilton, S.A. and Youngquist, R.S. 1995b. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol Reprod*; 53:951-957.
- Yaish, P., Gazit, A., Gilon, C., Levitzki, A. 1988. Blocking of EGF-dependent cell proliferation by EGF receptor kinase inhibitors. *Science*; 242:933-935.
- Yamamoto, K. 1995. Cathepsin E, Cathepsin D: biosynthesis processing and subcellular location. In: Takahashi, K. (ed) *Aspartic proteases: structure, function, biology and biomedical implications*. New York: Plenum Press; pp 223-229.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H. Thompson, C.B. and Korsmeyer, S.J. 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*; 80:285-291.
- Yang, J.C., Cortopassi, G.A. 1998. Induction of mitochondrial permeability transition causes release of the apoptogenic factor cytochrome C. *Free Radic Biol Med*; 24:624-631.
- Yang, M.Y. and Rajamahendra, R. 2000. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biology of Reproduction*; 62:1209-1217.
- Ying, S.Y. 1988. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr Rev*; 9:267-293.
- Yiu, X.M., Otvai, Z.N. and Korsmeyer, S.J. 1994. BH1 and BH2 domains of bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax. *Nature*; 369:321-323.
- Yokota, H., Yamada, K., Liu, X., Kobayashi, J., Abe, Y., Mizunuma, H. and Ibuki, Y. 1997. Paradoxical action of activin A on folliculogenesis in immature and adult mice. *Endocrinology*; 138:4572-4576.

- Yonish-Rouy, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. and Orey, M. 1991. Wild type p53 induces apoptosis of myeloid cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*; 352:345-347.
- Yoshida, H; Takakura, N. Kataoka, H; Kunisada, T; Okamura, H. and Nishikawa, S.I. 1997. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol*, 184:122-137.
- Yuan, W. and Giudice, L. 1997. Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteo status. *Clinical Endocrinology & metabolism*; 82:93148-93155.
- Zakeri, Z., Bursch, W., Tenniswood, M. and Lockshin, R.A. 1995. Cell death: programmed apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death Diff*; 2:83-92.
- Zamzami, N., Hirsch, T., Dallaporta, B., Petit, P.X. and Kroemer, G. 1997. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. *J Bioenerg Biomembra*; 29:185-193.
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B. and Kroemer, G. 1995b. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J Exp Med*; 182:367-377.
- Zanzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Zanin, c., Vayssière, J-L., Petit, P.X., Kroemer, G. 1995. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocytes death in vivo. *J Exp Med*; 181:1661-1672.
- Zanzami, N., Susin, S.A., Marchetti, T.h., G mez-Monterrey, I., Castedo, M. and Kroemer, G. 1996. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med*; 183:1533-1544.
- Zdolsek, J.M., Olsson, M.G., Brunk, U.T. 1990. Photooxidative damage to lysosomes of cultured macrophages by acridine orange. *Photochem Photobiol*; 51:67-76.
- Zdolsek, J.M., Roberg, K., Brunk, U.T. 1993b. Visualization of iron in cultured macrophages: a cytochemical light and electron microscopic study using autometallography. *Free Radical Biol Med*; 15:1-11.
- Zdolsek, J.M., Svensson, I. 1993. Effect of reactive oxygen species on lysosomal membrane integrity. *Virchows Arch B*; 64:401-406.
- Zdolsek, J.M., Zhang, H., Roberg, K., and Brunk, U.T. 1993a. H₂O₂ -mediated damage to lysosomal membranes of J774-cells. *Free Radic Res Commun*; 18:71-85.
- Zelenin, A.V. 1966. Fluorescence microscopy of lysosomes and related structures in living cells. *Nature*; 212:425-426.
- Zeleznik, A.J., Ihrig, L.L. and Bassett, S.G. 1989. Developmental expression of Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. *Endocrinology*; 125:2218-2220.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. and Korsmeyer, S.J. 1996. serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*; 87:619-628.
- Zhang, H., Olejnicka, B.,  llinger, K., Brunk, U.T. 1996. Starvation-induced autophagocytosis enhances the susceptibility of insulinoma cells to oxidative stress. *Redox Report*; 2:235-247.
- Zhang, H.,  llinger, K., Brunk, U.T. 1995. Insulinoma cells in culture show pronounced sensitivity to alloxan-induced oxidative stress. *Diabetologia*; 38:635-645.
- Zheng, T.S., Schlosser, S.F., Dao, T., hingorani, R., Crispe, I.N., Boyer, J.L. and Flavell, R.A. 1998. Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95:13618-13623.

- Zhou, J., Chin, E., Bondy, C. 1991. Cellular pattern of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology*; 129:3281-3288.
- Zhou, J; Kumar, T.R; Matzuk, M.M. and Bondy, C. 1997. Insulin-like growth factor 1 regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. *Mol Endocrinol*; 11:1924-1933.
- Zoller, L.C. and Weisz, J. 1979. A quantitative cytochemical study of glucose-6-phosphate dehydrogenase and delta 5-3beta-hydroxy-steroid dehydrogenase activity in membrana granulosa of the ovulable type of follicle of the rat. *Histochemistry*; 62:125-135.
- Zoller, L.C. and Weisz, J. 1978. Identification of cytochrome P-450 and its distribution in the membrana granulosa of the preovulatory follicle using quantitative cytochemistry. *Endocrinology*; 103:310-313.
- Zoratti, M and Szabó, I. 1994. Electrophysiology of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr*; 26:543-553.
- Zoratti, M. and Szabó, I. 1995. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*; 1241:139-176.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, A., Lutschg, A. and Wang, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*; 90:405-413.